

Am 11. 2751. 9

Université de Montréal

**ALTÉRATIONS DE LA PERMÉABILITÉ GLOMÉRULAIRE AU
COURS DU DIABÈTE**

Par

Michèle Doucet

Département de pathologie et biologie cellulaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en biologie cellulaire

JUILLET 1999

©MICHÈLE DOUCET, 1999



8m 11. 8721. 7

W
4
058
1999
V.142

ALTEIATIONS DE LA PERMEABILITE GLOMERULAIRE AU
COURS DU DIABETE

Par
MIRIAM DOUCET

Departement de Biologie et de Biochimie
Faculte de Medecine

Memoire presente a la Faculte des etudes superieures
en vue de l'obtention du grade de
Maitre es sciences (M.Sc.)
en Biologie Cellulaire

Mars 1999

MIRIAM DOUCET



IDENTIFICATION DU JURY

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

ALTÉRATIONS DE LA PERMÉABILITÉ GLOMÉRULAIRE AU COURS DU DIABÈTE

Présenté par:

Michèle Doucet

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Docteur Michel Desjardins.....président-rapporteur

Docteur Moïse Bendayan.....directeur de recherche

Docteur Jacques Paiement.....membre du jury

Mémoire accepté le: *99-10-27*

SOMMAIRE

La paroi glomérulaire joue un rôle important dans la filtration sanguine. Celle-ci comprend trois couches successives qui sont, à partir du capillaire vers l'espace urinaire, le feuillet endothélial, la membrane basale glomérulaire (MBG) et le feuillet épithélial. Dans des conditions normales, la paroi glomérulaire exclut le passage des macromolécules anioniques ainsi que celles qui ont une taille égale ou supérieure à 68 kDa. Ainsi, la concentration des macromolécules dans l'urine est généralement faible. Grâce à ses propriétés ultrastructurales et électrostatiques, la membrane basale glomérulaire agit comme un tamis moléculaire et constitue la principale barrière qui restreint le passage des macromolécules vers l'espace urinaire.

Au cours du diabète, les membranes basales glomérulaires du rein subissent un accroissement de leur épaisseur et leurs propriétés sélectives au niveau de la perméabilité glomérulaire sont altérées. Ces modifications structurales et fonctionnelles provoquent une protéinurie importante. De plus, au cours de la maladie, la filtration glomérulaire est augmentée, les protéines sériques et tissulaires subissent une glycation non-enzymatique et la composition biochimique de la MBG est modifiée. Pour le moment, il existe très peu de données concernant les modifications structurales et fonctionnelles qui se produisent au niveau de la MBG, dans des stades précoces du diabète.

Dans cette étude, nous avons induit le diabète chez des rats âgés d'un mois suite à l'injection de la streptozotocine. Dans un premier temps, nous avons examiné les tissus rénaux de rats normoglycémiques et de rats hyperglycémiques depuis dix jours, deux, quatre et six mois, afin d'évaluer la perméabilité glomérulaire chez ces animaux. Pour ce faire, nous avons étudié le passage de l'albumine sérique au travers la membrane basale glomérulaire en utilisant la technique d'immunocytochimie en microscopie électronique combinée à des analyses morphométriques. Afin de révéler les sites antigéniques correspondant à l'albumine endogène, nous avons utilisé des anticorps spécifiques contre l'albumine de rat suivie de la protéine A-or. Les analyses morphométriques des résultats obtenus nous ont permis de générer la distribution de l'albumine au travers des MBG. Les résultats démontrent que la perméabilité glomérulaire pour l'albumine endogène est significativement altérée après seulement dix jours d'hyperglycémie. En effet, chez ces animaux, l'albumine n'est plus retenue du côté subendothélial de la MBG, mais traverse cette dernière vers le côté épithélial. De plus, cette altération de la perméabilité glomérulaire devient plus importante avec la durée de l'état hyperglycémique.

Dans un deuxième temps, nous avons investigué certaines modifications structurales de la MBG chez les animaux hyperglycémiques. Pour ce faire, nous avons évalué la distribution du collagène de type IV à l'intérieur des MBG ainsi que l'épaisseur des MBG. Aucune modification structurale de la MBG n'a été observée chez les animaux normoglycémiques et chez les animaux hyperglycémiques de dix jours et de deux mois. L'épaississement des MBG ainsi que l'altération de la distribution du collagène de type IV n'ont été observés que chez les animaux

hyperglycémiques depuis quatre mois et plus. Ces résultats suggèrent que les altérations fonctionnelles de la MBG se produisent très tôt au cours du diabète, bien avant l'apparition des modifications structurales. D'autre part, certaines modifications se produisent très rapidement suite à l'induction du diabète chez les animaux. En effet, il semble que le taux de filtration glomérulaire ainsi que les charges intrinsèques de la MBG soient rapidement modifiés au cours du diabète. Cependant, le lien direct entre ces modifications précoces et la perte de la fonction glomérulaire n'a pas encore été démontré. Dans le but d'évaluer la réversibilité des altérations glomérulaires, des animaux hyperglycémiques depuis deux mois ont été traités quotidiennement à l'insuline pendant une période d'un mois. La normalisation de la glycémie a entraînée un rétablissement significatif des propriétés sélectives de la perméabilité glomérulaire.

Des travaux sur l'albumine glyquée ont démontré que sa présence dans le sang induisait rapidement une augmentation de la perméabilité glomérulaire chez l'animal normoglycémique. L'albumine glyquée circulante se forme très rapidement suivant l'induction du diabète et sa concentration dans la circulation est directement proportionnelle aux taux de glucose sanguin. La normalisation de la glycémie par le traitement à l'insuline, réduit possiblement la quantité d'albumine glyquée circulante et rétablit par le fait même la fonction glomérulaire. Ainsi, l'hyperglycémie semble avoir un rôle direct dans l'initiation de la glomérulopathie diabétique et ce en partie, via l'action des protéines glyquées circulantes.

MOTS CLÉS: Membrane basale glomérulaire, albumine, collagène de type IV, insuline, immunocytochimie.

TABLE DES MATIÈRES

PAGE TITRE.....	I
IDENTIFICATION DU JURY.....	II
SOMMAIRE.....	III
TABLE DES MATIÈRES.....	VI
LISTE DES TABLEAUX.....	IX
LISTE DES FIGURES.....	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XI
DÉDICACE.....	XV
AVANT-PROPOS.....	XVI
INTRODUCTION.....	1
LE CORPUSCULE RÉNAL.....	2
La capsule de Bowman.....	2
Le glomérule rénal.....	3
Le mésangium.....	5
LE FILTRE GLOMÉRULAIRE.....	7
L'endothélium fenestré.....	7
La membrane basale glomérulaire.....	9
<i>Le collagène de type IV.....</i>	<i>13</i>
<i>La laminine.....</i>	<i>18</i>
<i>Le nidogène.....</i>	<i>19</i>
<i>Les protéoglycanes.....</i>	<i>22</i>
<i>Autres éléments.....</i>	<i>24</i>
L'épithélium.....	24

FACTEURS DÉTERMINANT LES PROPRIÉTÉS SÉLECTIVES DU FILTRE GLOMÉRULAIRE.....	26
Facteurs hémodynamiques.....	27
<i>Régulation intrinsèque.....</i>	<i>31</i>
<i>Régulation extrinsèque.....</i>	<i>32</i>
Facteurs basés sur la taille.....	32
Facteurs basés sur la charge.....	36
Facteurs basés sur la conformation moléculaire.....	41
DIABÈTE.....	42
NÉPHROPATHIE DIABÉTIQUE.....	44
Altérations structurales au niveau du glomérule.....	44
<i>Lésions glomérulaires.....</i>	<i>44</i>
<i>Modifications biochimiques de la MBG.....</i>	<i>46</i>
<i>Modifications moléculaires et architecturales de la MBG.....</i>	<i>49</i>
Modifications cellulaires.....	51
Altérations fonctionnelles au niveau du glomérule.....	53
<i>Modifications des propriétés sélectives de la MBG basées sur la taille.....</i>	<i>56</i>
<i>Modifications des propriétés sélectives de la MBG basées sur la charge.....</i>	<i>57</i>
<i>Hyperfiltration glomérulaire.....</i>	<i>57</i>
PATHOGENÈSE.....	59
HYPERGLYCÉMIE ET GLOMÉRULOPATHIE DIABÉTIQUE.....	62

La voie du polyol.....	63
Glycosylation non-enzymatique.....	64
<i>Glycosylation non-enzymatique intermédiaire (Amadori).....</i>	<i>68</i>
<i>Glycosylation non-enzymatique avancée (AGE).....</i>	<i>69</i>
HYPOTHÈSE ET OBJECTIF DE NOTRE TRAVAIL.....	71
Modèle animal.....	73
Immunocytochimie.....	75
Principe de la protéine A-or.....	75
ARTICLE.....	77
DISCUSSION.....	115
CONCLUSION.....	139
BIBLIOGRAPHIE.....	142
REMERCIEMENTS.....	187

LISTE DES TABLEAUX

ARTICLE

PAGE

TABLE 1. 107 Characteristics of the control and diabetic rats

LISTE DES FIGURES

Mémoire

	PAGE	
Figure 1.	12	Modèle représentant la structure moléculaire de la membrane basale.
Figure 2a.	21	Schéma montrant la structure de la laminine.
Figure 2b.	21	Schéma montrant la structure du nidogène (entactine).
Figure 3.	38	Graphique de la clairance fractionnelle du diethylaminoethyl dextran, du dextran neutre et du dextran sulfate anionique en fonction du rayon moléculaire chez des rats normaux.
Figure 4	67	Schéma montrant les étapes de la glycosylation non-enzymatique.
Figure 5.	76	Schéma démontrant le principe de la protéine A-or.

Article

Figure 1.	111	Immuno-electron microscopy of endogenous albumin.
Figure 2.	112	Morphometrical analysis of albumin distribution.
Figure 3.	113	Morphometrical analysis of albumin distribution.
Figure 4.	114	Immuno-electron microscopy and morphometrical analysis of type IV collagen.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Mémoire

Å	Angstrom
ADN	acide désoxyribonucléique
AGE	Produit de Glycosylation Avancée (<i>Advance Glycosylation End-product</i>)
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucéique messenger
ATPase	adénosine-triphosphate
C_{in}	clairance de l'inuline
CF_M	clairance fractionnelle d'une macromolécule M
C_M	clairance d'une macromolécule M
DEAE	diethylaminoethyl dextran
ΔP	moyenne du gradient de pression hydrostatique transcapillaire
$\Delta \Pi$	moyenne du gradient de pression oncotique transcapillaire
DID	diabète insulino-dépendant
DNID	diabète non-insulino-dépendant
EHS	tumeur murine (<i>Engelbreth-Holm-Swarm</i>)
ELISA	test d'immuno-détection enzymatique (enzyme-linked immunosorbent assay)
ESR	rayon de Einstein-Stokes (<i>Einstein Stokes radius</i>)
FAK	kinase focale d'adhésion (<i>focal adhesion kinase</i>)
G1à G3	complexe globulaire du nidogène

GAG	glycosaminoglycane
GMPc	guanosine-monophosphate cyclique
HPL	lectine (ou agglutinine) de <i>Helix pomatia</i>
HRP	péroxydase du Raifort (<i>horse-radish peroxidase</i>)
HS	héparane sulfate
IgA	immunoglobuline de type A
IgG	immunoglobuline de type G
IgM	immunoglobuline de type M
KDa	kilo-Dalton
K _f	coefficient de filtration
L	litre
M	macromolécule
MBG	membrane basale glomérulaire
mg	milligramme
min	minute
ml	millilitres
mol	mole
mm Hg	millimètre de mercure
mmol	milli-molaire
Na	sodium
NC1	domaine globulaire non-collagénique 1
NC2	domaine globulaire non-collagénique 2
NITFG	taux de filtration glomérulaire pour un néphron individuel
nm	nanomètre

PAS	réactif périodique de la base de Schiff (<i>periodic acid-Schiff's reagent</i>)
P_c	pressions hydrostatiques artérielles moyenne
P_t	pression hydrostatique capsulaire moyenne
Π_t	pression oncotique capsulaire
Π_c	pression oncotique plasmatique
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PEI	polyéthylèneimine
pH	concentration en ions hydrogène
pI	point isoélectrique
P_{nf}	pression nette de filtration
PKC	protéine kinase C
Q_a	débit sanguin
RCA	lectine (ou agglutinine) de <i>Ricinus communis</i>
S	surface de filtration
$7s$	coefficient de sédimentation
TFG	taux de filtration glomérulaire
TGF- β	facteur de croissance transformant bêta (<i>transforming growth factor beta</i>)
UEA	lectine (ou agglutinine) de <i>Ulex europaeus</i>
WGA	lectine (ou abblutinine) du germe de blé (Wheat germ agglutinin)
ZO-1	<i>Zonula Occludence-1</i>
<u>Article</u>	
CL	Capillary lumen

°C	Celcius degree
fig	figure
figs	figures
g	gram
GBM	glomerular basement membrane
HSPG	heparane sulfate proteoglycans
KDa	kilodalton
Kg	kilogram
l	litre
mg	milligram
min	minute
mmol	millimole
mol	mole
mRNA	messenger ribonucleic acid
nm	nanometre
P	podocytes
PBS	phosphate buffer saline
pH	ion concentration
R	ratio
RIA	radioimmunoassay
STZ	streptozotocin
TGF-β	transforming growth factor
US	urinary space
μu	micro-unit

DÉDICACE

À mes parents Réjeanne et Pierre qui ont su m'encourager tout au long des épreuves. Vous êtes des parents merveilleux.

À ma sœur Karine, l'être qui m'est le plus cher sur cette terre.

Je vous aime

Michèle

AVANT-PROPOS

Certains des résultats décrits dans ce mémoire ont été présentés lors des congrès suivants:

- ❖ DOUCET, M., LONDOÑO, I. et BENDAYAN, M. Altérations de la perméabilité sélective de la paroi glomérulaire au cours du diabète. Journée scientifique du Département de pathologie et biologie cellulaire, Montréal (Québec), Canada, Mai 1998.
- ❖ DOUCET, M. LONDOÑO, I. et BENDAYAN, M. Altérations de la perméabilité sélective de la paroi glomérulaire au cours du diabète. 37^e congrès de L'AEGSFM, Montréal (Québec), Canada, janvier 1999.
- ❖ DOUCET, M., LONDOÑO, I. and BENDAYAN, M. Glomerular basement membrane selective permeability in streptozotocin-induced diabetic rats. 50th Annual Meeting of the Histochemical Society, Bethesda (Maryland), Etats-Unis, avril 1999.
- ❖ DOUCET M., LONDOÑO, I. and BENDAYAN, M. Altérations de la perméabilité sélective de la paroi glomérulaire au cours du diabète. Effet du traitement à l'insuline. Journée scientifique du Département de pathologie et biologie cellulaire, Montréal (Québec), Canada, mai 1999.

Introduction

La formation de l'urine au niveau du rein est un processus biologique essentiel au maintien de l'homéostasie corporelle. C'est à ce niveau que le sang est filtré et débarrassé de ses toxines et des déchets azotés. Le rein régule ainsi le volume et la composition chimique (pH) du sang en conservant l'équilibre entre l'eau et les électrolytes d'une part et en ajustant la concentration sanguine du HCO_3^- d'autre part. Les fonctions régulatrices du rein ne s'arrêtent pas là. Le rein produit l'érythropoïétine (Hartroft et coll., 1969) qui stimule la production d'érythrocytes dans la moelle osseuse et contribue ainsi au maintien de la capacité de transport de l'oxygène dans le sang. Il régule aussi la pression sanguine en produisant la rénine, l'enzyme qui catalyse la cascade menant à la conversion de l'angiotensinogène en angiotensine (Goldblatt, 1939). Enfin, les cellules rénales ont la propriété de transformer la vitamine D en sa forme active.

L'épuration sanguine et l'élaboration de l'urine incombent entièrement aux néphrons. Ceux-ci sont l'unité structurale et fonctionnelle du rein (Braus, 1924). Chez l'humain, chaque rein contient plus d'un million de néphrons situés au niveau du cortex et de la médullaire. Chaque néphron est composé de deux éléments principaux qui sont le corpuscule rénal et le tubule rénal. Ces deux structures ont chacune un rôle bien défini. Le corpuscule rénal est responsable de la filtration du plasma et de l'élaboration de l'urine primaire alors que les tubules rénaux jouent un rôle dans la réabsorption et la sécrétion.

LE CORPUSCULE RÉNAL

Le corpuscule rénal est une petite masse sphérique composée d'un bouquet de capillaires artériels appelés glomérule rénal (pour *glomus* qui signifie peloton) et d'une capsule de Bowman qui entoure complètement le glomérule. Le corpuscule possède deux pôles distincts. Le pôle vasculaire est caractérisé par la présence de vaisseaux sanguins alors que le pôle urinaire est défini par la chambre urinaire là où prend naissance le tubule contourné proximal. Chez l'humain le diamètre moyen d'un corpuscule rénal est d'environ 200 micromètres (120 micromètres chez le rat) (Rouillier, 1969).

La capsule de Bowman

La capsule de Bowman comprend un feuillet pariétal et un feuillet viscéral. Le feuillet pariétal qui forme la limite externe du corpuscule est constitué d'un épithélium simple pavimenteux. Au pôle urinaire du corpuscule, l'épithélium est en continuité avec les cellules épithéliales qui composent la paroi du tubule contourné proximal. Le feuillet pariétal a un rôle strictement structural et n'entre pas en contact avec le glomérule. Au niveau du pôle vasculaire, l'épithélium du feuillet pariétal s'invagine à l'intérieur de la capsule et se différencie pour former le feuillet viscéral qui est étroitement appliqué contre la face externe du glomérule. Les cellules épithéliales (ou podocytes) qui composent le feuillet viscéral ont des

prolongements cellulaires qui entourent complètement le capillaire sous-jacent. Les podocytes, l'endothélium capillaire ainsi que la membrane basale commune aux deux types cellulaires forment le filtre glomérulaire qui est responsable de la filtration du plasma sanguin. Entre les deux feuillets de la capsule de Bowman, se trouve une cavité; la chambre glomérulaire. Celle-ci communique directement avec la lumière du tube contourné proximal. C'est dans cette cavité que s'égoutte le filtrat ou l'urine primaire, après avoir été filtrée à travers le filtre glomérulaire.

Le glomérule rénal

Le glomérule occupe une grande partie de la cavité glomérulaire. Le glomérule est initié par une des artérioles afférentes provenant de l'artère interlobulaire. L'artériole afférente pénètre à l'intérieur de la capsule de Bowman au niveau du pôle vasculaire pour se diviser en 4 ou 6 branches qui donnent naissance à un réseau de capillaires étroitement anastomosés. L'endothélium de ces capillaires est de type *fenestré*. Pour cette raison, ces capillaires sont extrêmement poreux. Les anses capillaires sont supportées par un tractus de tissus conjonctif spécialisé, le mésangium qui s'étend au travers du glomérule à partir du pôle vasculaire. Au pôle vasculaire, les capillaires confluent pour former une artériole efférente qui ressort de la capsule de Bowman à côté de l'artériole afférente. L'artériole afférente, les capillaires ainsi que l'artériole efférente forment un système porte étant donné que les vaisseaux afférents et efférents sont tous deux des artérioles.

Les glomérules corticaux donnent naissance à un réseau de capillaires péritubulaires qui serpentent les différents segments des tubules proximaux et distaux du cortex rénal alors que les glomérules juxtamédulaires donnent suite à des vaisseaux droits descendants ou *vasa recta*, qui parcourent la pyramide de Malpighi de façon parallèle aux tubes urinaires droits.

Au niveau du pôle vasculaire, la paroi de l'artériole afférente est en contact intime avec la paroi du tubule contourné distal et plus précisément avec la *macula densa* du tubule contourné distal. Cette structure constitue l'appareil juxta-glomérulaire. À cet endroit, la media de la paroi de l'artériole afférente contient des cellules juxta-glomérulaires ou myoépithéliales. Ce sont des cellules musculaires lisses spécialisées qui diffèrent des cellules musculaires lisses typiques. Elles forment un manchon de plusieurs couches autour de l'artérioles afférentes et sont sensibles à la variation de la pression sanguine. Ces cellules possèdent un gros noyau et leur cytoplasme contient des granules qui peuvent être visualisées grâce à la technique de PAS (coloration à l'aide de la base périodique de Schiff) ou en microscopie électronique. Ces granules contiennent de la rénine (Pitcock et coll., 1959; Hartroft et coll., 1960; Goldblatt, 1939). L'appareil juxta-glomérulaire contrôle la pression sanguin en libérant la rénine dans la circulation. La rénine est sécrétée lorsque les barorécepteurs des cellules myoépithéliales détectent une baisse de la pression systémique. D'un autre côté, les cellules de la *macula densa* agissent comme des osmorécepteurs et sont capables de détecter les variations de la concentration en ions sodium dans le filtrat suite à une modification de la vitesse de filtration.

Le mésangium

Le mésangium qui se trouve entre les capillaires glomérulaires est constitué de cellules mésangiales et de la matrice mésangiale (Zimmermann, 1933). Les cellules mésangiales dérivent des cellules mésenchymateuses et ont une structure semblable aux péricytes (Schlondorff, 1987). Ces cellules ont été très bien décrites (Latta et coll., 1960; Farquhar et Palade, 1962). Elles ont une forme irrégulière, une région nucléaire dense ainsi que de longs prolongements cytoplasmiques. Ces cellules entourent les anses capillaires et s'introduisent au travers les composants de la membrane basale des cellules endothéliales. Les cellules mésangiales contiennent un riche réseau de microfilaments composé principalement d'actine, de α -actinine et de myosine (Mundel et coll., 1988; Drenckhahn et coll., 1990; Kriz et coll., 1990). Un des rôles principaux du mésangium est de prévenir la distension des capillaires suite à l'élévation de la pression hydrostatique intracapillaire (Drenckhahn et coll., 1990; Kriz et coll., 1990). Il est maintenant bien connu que les cellules mésangiales en culture possèdent des propriétés contractiles (Schlondorff, 1987; Michael et coll., 1980). En effet, il a été démontré que ces cellules pouvaient se contracter sous l'effet d'agents constricteurs comme l'angiotensine II, la vasopressine, la norepinéphrine et les thromboxanes (Schlondorff, 1987; Kreisberg et coll., 1985; Ausiello et coll., 1980). Au contraire, certains agents comme la dopamine et les prostaglandines, causent la relaxation des cellules en diminuant le taux de GMPc intracellulaire (Schlondorff, 1987). La présence de récepteurs pour l'angiotensine II ainsi que pour la vasopressine sur les cellules mésangiales a aussi été démontrée (Ausiello et coll., 1980; Venkatachalam et Kreisberg, 1985;

Kreisberg et coll., 1985; Sraer et coll., 1974). Toutes ces observations suggèrent que les cellules mésangiales sont impliquées dans la régulation de la filtration glomérulaire, grâce à leurs propriétés contractiles qui peuvent modifier certains paramètres hémodynamiques. Toutefois, ces affirmations sont controversées dans la littérature (Schlondorff, 1987). Des évidences morphologiques suggèrent que les cellules mésangiales peuvent aussi phagocyter et ainsi “nettoyer” le glomérule (Michael et coll., 1980; Elema et coll., 1976). Les cellules mésangiales présentent à leurs surface des récepteurs incluant la portion Fc des immunoglobulines G (IgG) et le C₃b (Striker et coll., 1987) ainsi que des antigènes reliés au système immunitaire (Striker et coll., 1987; Schreiner et coll., 1982; Yamamoto et coll., 1986). La présence de tout ces récepteurs et antigènes à la surface des cellules mésangiales, suggère que ces cellules jouent un rôle important dans la présentation d'antigènes lors de lésions glomérulaires immunes (Kaysen et coll., 1986; Couser et coll., 1984; Schreiner et coll., 1982). La membrane des cellules mésangiales contient aussi des intégrines β 1 qui sont des récepteurs connus pour la fibronectine et la laminine (Kerjaschki et coll., 1989; Gehlsen et coll., 1988). Ces récepteurs sont impliqués dans les interactions cellule-matrice. La composition de la matrice mésangiale est similaire à celle de la membrane basale glomérulaire, mis à part la présence du collagène de type II et V (Martinez-Hernandez et coll., 1982), de la fibronectine (Courtoy et coll., 1980), de l'actomyosine (Houser et coll., 1982) et de l'amyloïde-P (Dyck et coll., 1980) qui sont des éléments exclusifs à la matrice mésangiale.

LE FILTRE GLOMÉRULAIRE

Depuis les trois dernières décennies, beaucoup de travaux ont été entrepris dans le but de comprendre les bases biologiques qui régissent la filtration glomérulaire. Le concept de la filtration glomérulaire à été avancé il y a plus d'un siècle par Ludwig et Bowman (Ludwig, 1883; Bowman, 1842). Depuis ce temps, ce concept a bien évolué. Même si les bases fondamentales de la filtration ont été élucidées, beaucoup de questions restent encore obscures et sans réponse. L'unité de la filtration est une structure complexe qui se situe entre le sang et la chambre glomérulaire. Ce filtre glomérulaire pourrait être décrit comme une sorte de tamis moléculaire qui laisse librement passer l'eau et les molécules plus petites que l'albumine sérique. Avant d'identifier les nombreux facteurs qui influencent et qui régulent la filtration glomérulaire, il convient de bien connaître les différents constituants qui déterminent la nature même de cette barrière moléculaire. L'unité de filtration est composée de trois couches successives qui sont dans l'ordre (à partir de la lumière capillaire vers la chambre glomérulaire) l'endothélium capillaire, la membrane basale glomérulaire et l'épithélium.

L'endothélium fenestré

Les cellules endothéliales constituent la barrière initiale qui empêche le passage des constituants cellulaires du sang vers la chambre glomérulaire. En effet, dans

des conditions normales, les érythrocytes, les leucocytes ainsi que les plaquettes sanguines n'atteignent pas l'espace subendothélial de la membrane basale glomérulaire. Cependant, l'endothélium présente de nombreux pores ayant un diamètre assez important. Par exemple, chez l'humain, ces pores ont un diamètre qui mesure environ 100nm (Jørgensen et coll., 1966) et représentent approximativement 54 % de la surface endothéliale (Bulger et coll., 1983). Ces pores peuvent laisser passer jusqu'à 170 L de liquide par jour et ne présentent aucune résistance au passage des protéines et des liquides plasmatiques. Les cellules endothéliales possèdent un vaste réseau de filaments minces, de microtubules et de filaments intermédiaires. Les régions cellulaires près des fenestrations sont très riches en microfilaments (Vasmant et coll., 1984). La surface de ces cellules est chargée négativement à cause de la présence de la podocalyxine, une sialo-protéine qui est aussi présente à la surface des cellules épithéliales (Kerjaschki et coll., 1984; Latta et coll., 1975; Mohos et Skoza, 1969). Les vésicules plasmalemmales peuvent aussi contenir des héparanes sulfates protéoglycanes (Simionescu et coll., 1981), des résidus d'acide neuraminique (Latta et coll., 1975) et de la podoendine (Huang et Langlois, 1985). Toutes ces glycoprotéines de surfaces contribuent au maintien des propriétés sélectives de la barrière glomérulaire. Finalement, certains antigènes (antigènes de groupes sanguins "ABO" ainsi que des antigènes d'histocompatibilité de type I et II) se trouvent aussi à la surface des cellules endothéliales

La membrane basale glomérulaire

La membrane basale est un mince lacis de composants de matrice extracellulaire qui borde le pôle basal de la plupart des cellules épithéliales et endothéliales. La membrane basale glomérulaire (MBG) possède des propriétés fonctionnelles et structurales très caractéristiques et diffère donc des membranes basales que l'on retrouve dans d'autres tissus. En effet, la MBG qui se trouve entre l'épithélium viscéral du glomérule et l'endothélium du capillaire, constitue la principale barrière de filtration permettant le passage de l'eau et des électrolytes mais restreignant le passage des protéines plasmatiques vers l'espace urinaire (Caulfield et Farquhar, 1974; Farquhar, 1981; Karnovsky, 1979). Environ 125 ml de plasma passe au travers la MBG toutes les minutes. De cette façon, la MBG filtre tout le volume plasmatique d'un individu plus de 60 fois par jour. Structurellement, la MBG diffère des autres membranes basales par le fait qu'elle est la résultante de deux membranes basales d'origine distincte; l'une est formée par les cellules endothéliales et l'autre par les podocytes (Reeves et coll., 1980; Sariola et coll., 1984; Thorning et Vracko, 1977; Vernier et Birch-Anderson, 1962; Abrahamson, 1985; Desjardins et Bendayan, 1991). Au cours de la néphrogenèse, ces deux membranes basales fusionnent pour former chez l'humain, une membrane basale glomérulaire unique d'environ 350nm d'épaisseur (Østerby, 1972; Steffes et coll., 1983) et de 135 nm chez le rat (Rasch, 1979a). Par ce fait même, la MBG est beaucoup plus épaisse que la plupart des autres membranes basales qui ont généralement une épaisseur d'environ 60 à 100 nm. (Pihlajaniemi, 1996). À la suite de cette fusion, la MBG subit une phase de maturation. Différentes études

utilisant des traceurs denses aux électrons, ont démontré qu'au cours du développement, la MBG acquérait de façon progressive ses propriétés sélectives (Vernier et Birch-Anderson, 1963; Reeves et coll., 1980; Bakala et coll., 1985). Des études immunohistochimiques ont révélé des différences importantes dans le patron moléculaire des constituants de la MBG chez le fœtus et l'adulte (Michael et coll., 1983; Wan et coll., 1984; Mounier et coll., 1986; Wingen et coll., 1987). Les modifications qui se produisent au niveau de la MBG lors de cette maturation ont suscité l'intérêt de beaucoup de chercheurs. Récemment Desjardins et coll. (Desjardins et Bendayan, 1991), ont montré une corrélation entre les changements dans la distribution des différents constituants de la MBG et l'acquisition des propriétés fonctionnelles de la MBG au cours de la maturation. Chez le rat, la maturation de la MBG est un processus qui persiste au cours de l'âge. Ainsi, il y aurait une coordination entre la synthèse et la réorganisation des composants de la MBG afin de permettre à celle-ci de demeurer fonctionnelle (Walker, 1973; Desjardins et Bendayan, 1991)

L'apparence ultrastructurale de la MBG en microscopie électronique à transmission est très caractéristique. La MBG est divisée en trois régions successives: Une zone claire du côté subendothélial appelée *lamina lucida interna*, une zone centrale qui est dense aux électrons, la *lamina densa* et une zone subépithéliale claire, la *lamina lucida externa* (Kasinath et Kanwar, 1993). Cependant, plusieurs auteurs ont démontré que la *lamina lucida interna* et la *lamina lucida externa* étaient des artéfacts causés lors de la préparation du tissu pour des fins de microscopie électronique (Chan et coll., 1993; Chan et Inoue, 1994). Cet artéfact est évité

lorsque le tissu rénal est préparé à l'aide de la technique de cryo-substitution (Reale et Luciano, 1990; Chan et coll., 1993; Inoue et Bendayan, 1995). La membrane basale glomérulaire apparaît alors complètement dense aux électrons. Bien que la composition moléculaire de la MBG soit similaire à celle des membranes basales que l'on retrouve dans d'autres tissus, elle possède certaines caractéristiques qui lui sont spécifiques (Timpl et Dziadek, 1986). Les composants majeurs de la MBG sont le collagène de type IV, la laminine, certains protéoglycanes et le nidogène (aussi appelé entactine). D'autres protéines sont aussi présentes, mais en plus faibles quantités. Toutes ces protéines semblent interagir intimement pour former une matrice hautement organisée (voir figure 1). L'intégrité de tous ces éléments est essentielle au maintien normal des propriétés filtrantes (Yurchenco et coll., 1986; Grant et coll., 1989; Yurchenco et Shittny, 1990).

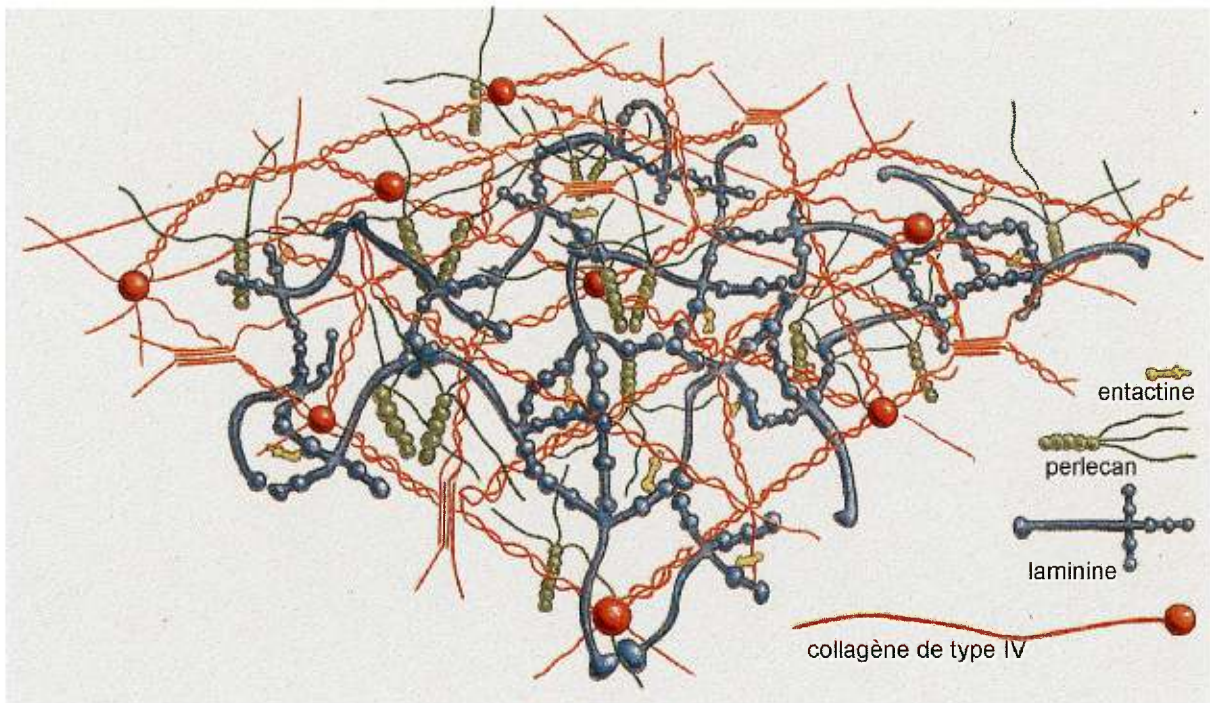


Figure 1 : Modèle représentant la structure moléculaire de la membrane basale.

Figure modifiée de Yurchenco PD et Schittny JC, 1990. Publiée dans
Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K et Watson JD (1994)
The Cell, 3th edition, Garland Publishing Inc., New York & London, pp.991.

Collagène de type IV

Le collagène de type IV est la protéine structurale majeure de la MBG. Cette dernière fait partie de la grande famille des protéines collagéniques. Jusqu'à maintenant, 19 formes de collagène différent ont été caractérisées (Mayne et Brewton, 1993; Kivirikko, 1993). Celles-ci sont réparties dans plusieurs types tissulaires. Le collagène de type IV se retrouve uniquement au niveau des membranes basales, contrairement à d'autres formes de collagène qui peuvent être ubiquitaires. De plus, les molécules de collagène de type IV ne forment pas de fibrilles striées comme les autres types de collagène fibrillaire (I II III), mais elles s'associent plutôt entre elles pour former un réseau laminaire réticulé en feuillet qui confère à la membrane basale sa forme et sa rigidité. La molécule de collagène de type IV a un poids moléculaire d'environ 500 kDa. Elle est formée comme toutes les autres protéines collagéniques par l'association de trois chaînes polypeptidiques α qui forment ensemble une hélice tricaténaire longue de 440 nm. Chacune des chaînes α est divisée en trois domaines structuraux distincts (Timpl et Dziadek, 1986; Timpl, 1989). Le premier domaine distinct (NC1) qui se situe du côté C-terminal de la protéine, a été très conservé au cours de l'évolution. Ce domaine comporte une structure globulaire non-collagénique d'environ 230 acides aminés. Le domaine NC1 est résistant à la dégradation par les collagénases. Les études concernant les interactions entre les différentes chaînes α via leur domaine NC1 ont permis de mieux comprendre la stœchiométrie de la molécule de collagène IV. L'extrémité N-terminale de la chaîne α est aussi caractérisée par une séquence non-collagénique (NC2) d'environ 14 à 23 acides aminés. Ce domaine riche en

cystéine et en lysine se nomme 7S à cause de son coefficient de sédimentation (Risteli et coll., 1980). Entre ces deux extrémités se trouve le domaine collagénique de la molécule. Ce dernier comporte environ 1 400 acides aminés constitués par la répétition du triplet d'acides aminés Gly-X-Y. Les répétitions de ces trois acides aminés sont interrompues à 21 ou 26 sites par de courtes séquences non-collagéniques. La présence de l'acide aminé glycine à tous les trois résidus est essentielle pour l'association des chaînes α en triple hélice. De plus, la présence des nombreuses interruptions dans le patron répétitif Gly-X-Y confère à la molécule une plus grande flexibilité et une meilleure sensibilité aux attaques protéolytiques. (Timpl, 1989). Le rôle fonctionnel de ces interruptions est probablement très important, car la position et la longueur de ces interruptions sont très conservées entre les différentes chaînes α . En effet, il y a une forte homologie entre les sites d'interruption des chaînes s'associant ensemble. De plus, la présence de cystéine au niveau de ces interruptions suggère que ces sites jouent un rôle dans l'enchevêtrement des chaînes.

Jusqu'à maintenant, on a identifié six chaînes de type IV différentes ($\alpha 1(IV)$ - $\alpha 6(IV)$), chacune codée par des gènes différents (Mayne et Brewton, 1993; Kivirikko, 1993; Zhou et coll., 1993). Chez l'humain, COL4A1 et COL4A2, sont les gènes qui codent pour les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ respectivement. Ils ont été découverts sur un même locus chromosomique, soit au niveau du locus 13q34 (Emanuel et coll., 1986; Boyd et coll., 1988). Les gènes COL4A3 et COL4A4 qui codent pour les chaînes $\alpha 3$ et $\alpha 4$ respectivement, se trouvent sur le locus chromosomique 2q35-3 (Morrison et coll., 1991; Kamagata et coll., 1992), alors que les gènes qui codent

pour les chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6$, COL4A5 et COL4A6, se trouvent sur le locus chromosomique Xq22 (Hostikka et coll., 1990; Zhou et coll., 1993; Oohashi et coll., 1994). Ainsi, les trois paires de gènes codant pour le collagène de type IV, résident sur trois chromosomes différents. Les gènes humains COL4A1, COL4A2, COL4A5 et COLA6 ont tous été caractérisés (Zhou et coll., 1994; Oohashi et coll., 1995) alors que COL4A3 et COL4A4 ne le sont pas encore complètement (Quinones et coll., 1992; Sugimoto et coll., 1993).

Théoriquement, il pourrait y avoir plusieurs possibilités de combinaison entre les différentes chaînes α , et il pourrait donc y avoir plusieurs formes de molécules de collagène de type IV, cependant très peu de combinaisons différentes ont été identifiées jusqu'à maintenant. La forme moléculaire la plus abondante au niveau des membranes basales est constituée par l'association de deux chaînes $\alpha 1$ et d'une chaîne $\alpha 2$. La forme homotrimérique comprenant trois chaînes $\alpha 1$ a aussi été identifiée au niveau des membranes basales (Timpl et Dziadek, 1986; Timpl, 1989). Plus récemment, Kleppel et ses collaborateurs (Kleppel et coll., 1992) ont mis en évidence l'association entre deux chaînes $\alpha 3$ avec une chaîne $\alpha 4$ ainsi que l'association entre trois chaînes $\alpha 3$ au niveau de la MBG. De plus, des études récentes suggèrent que deux chaînes $\alpha 5$ pourraient former une triple hélice avec une chaîne $\alpha 3$ ou avec une chaîne $\alpha 4$ au niveau de la MBG (Ninomiya et coll., 1995), cependant ceci est encore controversé (Sariola et coll., 1996).

Ce n'est que dans les années 80s, que l'on a compris les mécanismes moléculaires impliqués lors de l'auto-assemblage des molécules de collagène de type IV en

réseaux complexes (Timpl et coll., 1981; Yurchenco et Furthmayr, 1984; Yurchenco et O'Rear, 1993). Le modèle de réseau collagénique en multi-couches est basé sur des modèles d'association *in vitro* observés en microscopie électronique à l'aide de la technique d'ombrage rotatoire (Yurchenco et coll., 1986). L'assemblage moléculaire du réseau collagénique comprend trois grandes étapes. Dans un premier temps, deux molécules de collagène IV (deux triples hélices monomériques) s'associent via leur domaine NCI, pour former un dimère linéaire. Cette association est ensuite stabilisée par la formation de liaisons disulfures entre les cystéines des domaines NC1 (Siebold et coll., 1988). Dans un deuxième temps, quatre monomères s'associent ensemble par les extrémités N-terminales via des interactions parallèles et anti-parallèles (Timpl et coll., 1980; Duncan et coll., 1983; Oberbaumer et coll., 1982; Kuhn et coll., 1981). Cette tétramérisation est initiée par des liens non-covalents hydrophobes à la surface des bouts 7S des quatre molécules de collagène (Siebold et coll., 1987). La structure tétramérique est par la suite stabilisée par des liaisons croisées non-réductibles entre les lysines des molécules antiparallèles ainsi que par l'ajout de liaisons disulfures entre les quatre molécules (Siebold et coll., 1987; Glanville et coll., 1985; Tsilibary et Charonis, 1986). Cet arrangement tétramérique devient alors résistant aux dégradations protéolytiques. La présence d'unités oligosaccharidiques liées aux asparagines présentes au niveau des domaines 7S joue aussi un rôle dans la stabilisation des liens au niveau de la structure tétramérique (Nayak et Spiro, 1991). Outre les associations moléculaires qui se forment aux deux bouts des monomères, il se produit aussi des associations moléculaires latérales (Tsilibary et Charonis, 1986).

Les chaînes α_1 , α_2 , α_3 , α_4 et α_5 ont toutes été détectées au niveau de la MBG. La chaîne α_6 a été détectée au niveau des membranes basales situées au niveau de la capsule de Bowman et de certains tubules distaux, mais jamais au niveau des MBG (Ninomiya et coll., 1995). Au niveau de la MBG mature, les molécules de collagène IV ont des distributions très hétérogènes (Butkowski et coll., 1989; Desjardins et coll., 1990). La sélectivité de la MBG semble être influencée par la conformation et la distribution des différentes molécules de collagène de type IV (Desjardins et Bendayan, 1991). En effet, en utilisant des techniques immunocytochimiques en microscopie électronique avec des anticorps spécifiques pour chacune des chaînes, Desjardins et Bendayan ont démontré chez le rat que quatre jours suivant la naissance des animaux, les membranes basales épithéliale et endothéliale ne sont pas encore fusionnées et toutes deux contiennent les chaînes α_1 et α_2 mais ne contiennent pas la chaîne α_3 . Après la fusion des deux membranes basales, la distribution pour les chaînes α_1 et α_2 est uniforme au travers toute l'épaisseur de la MBG. Cependant au cours de la maturation, le marquage de α_1 et α_2 décroît de façon importante et devient progressivement restreint au côté subendothélial de la MBG. Parallèlement, le marquage pour les chaînes α_3 et α_4 augmente avec le temps et celui-ci est présent au travers toute l'épaisseur de la MBG. Au cours de cette même étude, Desjardins et Bendayan ont démontré que la redistribution progressive des molécules de collagène, était corrélée à l'acquisition graduelle des propriétés fonctionnelles de la MBG. Ces résultats suggèrent fortement que la structure du collagène IV joue un rôle primordial lors de la filtration glomérulaire. Nous reviendrons sur cet aspect un peu plus loin.

Laminine

La laminine est le composant non-collagénique majeur des membranes basales. Jusqu'à présent, on connaît six isoformes différentes. Cette glycoprotéine porte de nombreux sites de fixations de haute affinité pour les autres éléments de la membrane basale. Cette protéine est donc un pilier structural très important au niveau des membranes basales. La laminine joue aussi un rôle dans plusieurs fonctions biologiques incluant l'attachement cellulaire, la prolifération et la différenciation cellulaire (Timpl et Dziadek, 1986; Beck et coll., 1990; Engel, 1992; Engel, 1993; Tryggvason, 1993). À l'aide de la technique d'ombrage rotatoire en microscopie électronique, on reconnaît la laminine par sa forme en croix très caractéristique (figure 2a). À ce jour, les connaissances biochimiques sur la laminine proviennent surtout d'études effectuées à partir de la laminine isolée des tumeurs de souris (EHS) (Timpl et coll., 1979). La laminine est formée par l'association parallèle de trois sous-unités distinctes. Une grande sous-unité A (300-400kDa) est placée au centre de la protéine et deux petites sous-unités B1 et B2 (180-200 kDa) sont placées de chaque côté de la grande sous-unité A (Cooper et coll., 1981). L'extrémité C-terminale de la sous-unité A se termine par un gros domaine globulaire qui est reconnu par certains protéoglycanes (Sakashita et coll., 1980; Ott et coll., 1982; Beck et coll., 1990). De plus, les deux domaines globulaires situés à l'extrémité N-terminale de la sous-unité B1 sont reconnus par le collagène de type IV (Rao et coll., 1982; Laurie et coll., 1986) alors que le domaine globulaire N-terminal de la sous-unité B2 est reconnu par d'autres collagènes et par certains groupes esters sulfates lipidiques. Il semble que la partie centrale de

la protéine soit reconnue par le nidogène (entactine) (Paulsson et coll., 1987; Sakashita et coll., 1980). D'après plusieurs chercheurs (Desjardins et Bendayan, 1990; Kerjaschki et coll., 1986; Grant et Leblond, 1988; Abrahamson, 1986), la laminine semble être distribuée au travers toute l'épaisseur de la MBG mais principalement au niveau de la *lamina densa*. La localisation ultrastructurale de la laminine reflète son rôle important dans l'interaction avec les autres éléments de la MBG.

Des études *in vitro* ont démontré que l'agrégation des molécules de laminine formait un réseau indépendant à l'intérieur des membranes basales. Ce phénomène est dépendant du calcium et de la température (Yurchenco et O'Rear, 1993). De plus, il est maintenant clair que la laminine est produite très tôt lors du développement, bien avant l'apparition du collagène de type IV (Ekblom et coll., 1993). Tous ces résultats suggèrent que la laminine est un composant essentiel dans l'organisation ainsi que dans le maintien architectural et fonctionnel des membranes basales.

Nidogène

Le nidogène (Timpl et coll., 1983) aussi appelé entactine (Carlin et coll., 1981), est aussi une glycoprotéine importante faisant partie de la membrane basale glomérulaire. Cette protéine en forme de bâtonnet a un poids moléculaire de 158 kDa et possède trois domaines globulaires (figure 2b). Le nidogène se lie de façon

non-covalente à la laminine via son complexe globulaire G3 situé du côté c-terminal (Mann et coll., 1988; Gerl et coll., 1991; Mayer et coll., 1993). Cette liaison est extrêmement stable. Le nidogène se lie aussi au collagène de type IV, cependant, le mécanisme de cette liaison est encore obscur. Par contre, des études semblent indiquer que le nidogène se lie au collagène via son domaine globulaire G2 (Fox et coll., 1991). Cette même région est aussi reconnue par le noyau protéique des héparanes sulfates protéoglycanes (Battaglia et coll., 1992). Comme la laminine, à cause de ses nombreux sites de liaisons avec plusieurs éléments des membranes basales, le nidogène semble jouer un rôle important dans l'organisation structurale de ces dernières. De plus, le nidogène est extrêmement sensible à la dégradation par les protéases. Cette protéine serait impliquée dans le remodelage des membranes basales (Timpl et Dziadek, 1986; Timpl et coll., 1983; Chung et Durkin, 1990). Le nidogène est distribué au travers toute l'épaisseur de la MBG (Desjardins et Bendayan, 1990,1991).

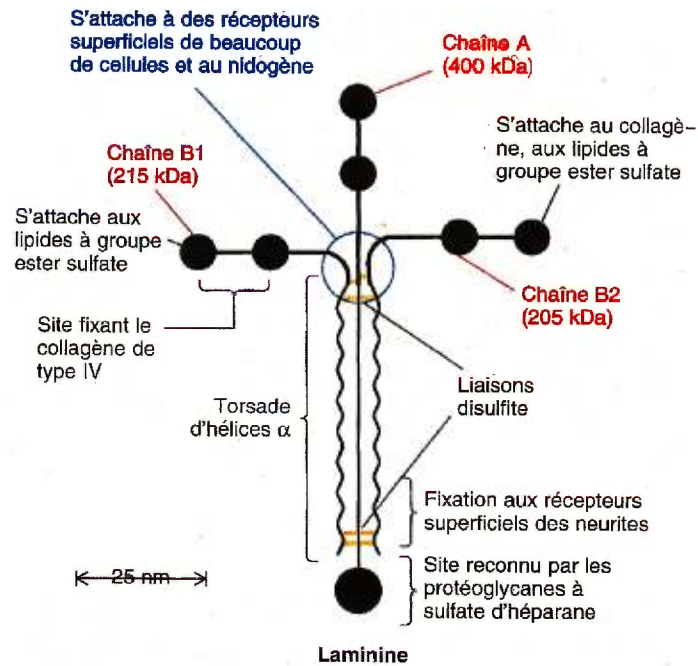


Figure 2a : Schéma montrant la structure de la laminine.

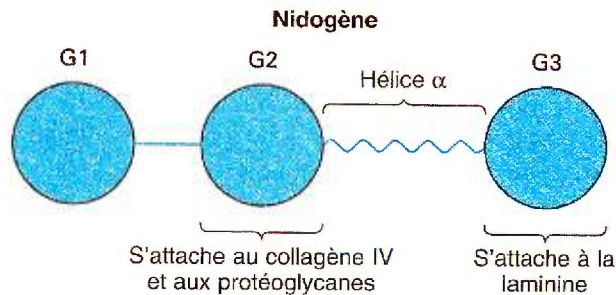


Figure 2b : Schéma montrant la structure du nidogène (entactine).

Figure 3a d'après Martin et Timpl, 1987; figure 3b d'après Reinhardt et coll., 1993. Publiées dans Lodish, Baltimore, Berk, Zipursky, Matsudaira et Darnell (1997) *Biologie moléculaire de la cellule*. DeBoeck Université, pp.1144.

Protéoglycanes

Les protéoglycanes sont des macromolécules présentes dans tous les types de membranes basales (Kjellen et Lindahl, 1991; Noonan et Hassel, 1993). Ils sont constitués d'une charpente protéique centrale dont certaines des sérines lient de façon covalente (par des liens O-glycosydiques) un ou plusieurs polysaccharides anioniques appelés glycosaminoglycanes (GAG). La structure protéique de ces molécules diffère énormément d'une molécule à l'autre. On connaît jusqu'à présent six glycosaminoglycanes différents qui sont l'acide hyaluronique, le dermatane sulfate, le kératane sulfate, l'héparine, l'héparane sulfate et la chondroïtine sulfate. Ces glycosaminoglycanes sont de longues chaînes polysaccharidiques non ramifiées composées d'unités disacchariques répétitives. L'un des deux résidus glucidiques du motif disaccharidiques est toujours un glucide aminé (N-acétylglucosamine ou N-acétylgalactosamine). Dans la majorité des cas, ce glucide est sulfaté et le second est un acide uronique. Les résidus glucidiques des glycosaminoglycanes portent des groupements sulfates ou carboxyles qui sont chargés négativement, ce qui explique en partie la nature anionique des membranes basales. Ces charges négatives à l'intérieur des membranes basales ont une première fonction structurale très importante. Elles attirent un nuage de cations, tel que le Na^+ , qui génèrent une pression osmotique et provoquent par le fait même l'absorption de grandes quantités d'eau dans la membrane basale. Ceci crée une pression turgescence qui rend la membrane basale plus résistante aux forces de compression.

En 1979, Kanwar et Farquhar (Kanwar et Farquhar, 1979a) ont effectué des études histologiques au niveau de la MBG. En utilisant des traceurs cationiques tel que la ferritine cationique, le fer colloïdal et le rouge de ruthénium, ils démontrèrent pour la première fois, la présence de sites anioniques au niveau de la membrane basale glomérulaire. Plus tard, en utilisant des techniques de digestion avec des enzymes spécifiques, ils démontrèrent que ces sites anioniques sont constitués de protéoglycanes riches en héparanes sulfates (Kanwar et Farquhar, 1979b; Kanwar et Farquhar, 1979c). Par la suite, des résultats similaires ont été obtenus au niveau de MBG de chien et de rat (Linker et coll., 1981), ainsi qu'au niveau de MBG de bœuf (Parthasarathy et Spiro, 1981) et confirmèrent ainsi les résultats de Kanwar et de Farquhar. Bien que les héparanes sulfates soient le composant anionique majeur de la GBM (Kanwar et Farquhar, 1979a; idem, 1979b), la chondroïtine sulfate et l'acide hyaluronique sont aussi présents dans la MBG, mais en plus faibles quantités que l'héparane sulfate. On sait aujourd'hui que le perlecan est le protéoglycane héparane sulfate le plus abondant au niveau des membranes basales (Noonan et Hassell, 1993). Ces glycosaminoglycanes jouent un rôle important au niveau de la sélectivité de la paroi glomérulaire (Comper et Laurent, 1978; Lindahl et Höök, 1978; Kanwar et coll., 1980). Étant donné que les polypeptides dans la MBG présentent un faible excès de charges positives, la localisation et la distribution des glycosaminoglycanes doit être stratégique pour que les charges anioniques puissent avoir un effet sélectif maximal. Les héparanes sulfates sont localisés principalement au niveau de la lamina *rara interna* et *externa* (Kanwar et Farquhar, 1979a; Desjardins et Bendayan, 1990; Kerjaschki et coll., 1986; Stow et coll., 1985).

Autres éléments

D'autres protéines ont été identifiées au niveau des MBG, cependant, leurs structures biochimiques ainsi que leurs fonctions sont moins bien connues. Le collagène de type V (Martinez-Hernandez et coll., 1982) et VI (Zhu et coll., 1994; Regoli et coll., 1998) sont aussi présents dans les MBG mais en faibles quantités. La présence de la fibronectine a été démontrée par immunocytochimie au niveau de la MBG (Kasinath et Kanwar, 1993), cependant on ne connaît pas encore son rôle. Une glycoprotéine de 72-80 kDa, la bamine, a récemment été isolée de la tumeur de souris EHS et révélée par immunocytochimie au niveau des MBG (Robinson et coll., 1989). Cette protéine n'a été révélée dans aucune autre membrane basale du rein, ce qui suggère qu'elle pourrait avoir un rôle spécifique dans la MBG.

L'épithélium

L'épithélium constitue la dernière barrière du filtre glomérulaire. L'épithélium est composé de cellules volumineuses (podocytes) caractérisées par un cytoplasme riche en microtubules et en microfilaments. Les podocytes ont de plus un appareil de Golgi bien développé (Vasmant et coll., 1984). Ces cellules épithéliales ont une structure très particulière. Leur cytoplasme donne naissance à de longs prolongements cellulaires qui eux même donnent naissance à plusieurs petits

prolongements de deuxièmes ordres, qui se nomment pédicelles à cause de leur forme qui ressemble à des petits pieds. Les pédicelles se disposent régulièrement à la surface des capillaires et l'espace qui les sépare forme les fentes de filtration. En microscopie électronique, on peut voir que les pédicelles adjacents n'appartiennent pas nécessairement à des prolongements issus du même podocyte. En effet, les pédicelles d'une cellule donnée, alternent avec des pédicelles de podocytes voisins. Cet arrangement donne un aspect de dent de peigne aux pédicelles appuyés sur une membrane basale glomérulaire (Arakawa, 1971). Les pédicelles possèdent un cytoplasme qui contient de gros filaments typiques aux filaments de myosine retrouvés au niveau des cellules musculaires (Pease, 1968). De plus, le cytoplasme de ces cellules est particulièrement riche en filaments d'actine (Vasmant et coll., 1984; Lachapelle et Bendayan, 1991). Dans un glomérule normal, la largeur des fentes de filtration entre les différents pédicelles, varie entre 25 et 60 nm. En théorie, ces fentes ne devraient pas laisser passer des protéines ayant une taille supérieure à celle de l'albumine. À fort grossissement en microscopie électronique, on distingue un diaphragme entre les pédicelles qui recouvrent les fentes de filtration (Yamada, 1955; Farquhar et coll., 1961; Latta, 1970; Rodewald et Karnovsky, 1975). Ce diaphragme a un diamètre d'environ 11 nm et se trouve à environ 60 nm de la membrane basale glomérulaire (Farquhar et coll., 1961). La composition biochimique de ce diaphragme n'est pas connue. Toutefois, la ZO-1, une protéine spécifique des jonctions serrées, est associée à ces diaphragmes (Schnabel, 1990). La surface des podocytes est recouverte d'acide sialique (Latta et coll., 1975). Kerjaschki et coll. (Kerjaschki et coll., 1984) ont identifié la principale sialo-protéine, la podocalaxine. Celle-ci est

localisée préférentiellement à la surface membranaire des podocytes qui fait face à l'espace urinaire. Cette dernière a des propriétés électronégatives. De plus, la perfusion du rein avec la neuraminidase qui enlève les acides sialiques, provoque le détachement des podocytes. Ceci suggère que ces sites chargés négativement, sont importants pour maintenir la structure et la fonction de la barrière de filtration (Kanwar et Farquhar, 1980). Nous reviendrons sur la fonction de ces sites chargés négativement au niveau de la perméabilité glomérulaire.

FACTEURS QUI DÉTERMINENT LES PROPRIÉTÉS SÉLECTIVES DU FILTRE GLOMÉRULAIRE

Dans les années 60 et 70, plusieurs scientifiques, Farquhar, Karnovsky, Cotran, Venkatachalam ainsi que Brenner, ont utilisé des approches morphologiques et physiologiques innovatrices afin de d'élucider la fonction du glomérule. Ces derniers ont par le fait même, décrit certains mécanismes pathologiques qui contribuent à la perte des protéines dans l'urine. Depuis ce temps, les études à ce sujet n'ont pas cessé de progresser. À présent, les connaissances que nous avons sur la biologie du glomérule proviennent de divers types d'approches incluant, la physiologie, la biochimie, l'immunologie et la biologie cellulaire et moléculaire.

La formation de l'urine primaire est un processus passif au cours duquel, les liquides et les solutés sont poussés à travers la paroi glomérulaire vers la chambre

glomérulaire et ce, uniquement par la force de pression hydrostatique intraglomérulaire. Comme la formation du filtrat ne nécessite pas d'énergie métabolique, on peut considérer la paroi glomérulaire comme un simple filtre mécanique. La paroi glomérulaire est sélective. En effet, elle ne laisse pas passer les macromolécules qui ont une taille égale ou plus grande que 68 kDa. De plus, elle repousse les macromolécules qui sont chargées négativement, mais elle ne restreint pas le passage de l'eau et des électrolytes. Au cours des dernières années, beaucoup de travaux ont été effectués dans le but de comprendre les facteurs qui déterminent la sélectivité de la perméabilité glomérulaire. On sait aujourd'hui que la taille, la charge, et plusieurs facteurs hémodynamiques influencent la filtration glomérulaire et plus particulièrement la filtration des macromolécules (*permselectivity*). Au cours de certaines pathologies, plusieurs de ces déterminants peuvent être modifiés, ce qui entraîne dans plusieurs cas l'apparition d'une protéinurie. Il n'est donc pas étonnant que ces maladies servent de modèle dans l'étude de la fonction glomérulaire. Dans la suite de cette introduction, nous décrirons de façon concise, les différents déterminants qui influencent la filtration glomérulaire des macromolécules, et dans un deuxième temps, nous caractériserons le rôle de ces facteurs dans le contexte de néphropathie diabétique.

Facteurs hémodynamiques

Les principes de la dynamique de la formation du liquide interstitiel dans tous les lits capillaires s'appliquent également à la formation de l'urine primaire (filtrat) dans le

glomérule. Toutefois, le filtre glomérulaire constitue un filtre beaucoup plus efficace que les autres lits capillaires. En effet, les reins produisent environ 180 L de filtrat quotidiennement, alors que tous les autres lits capillaires de l'organisme tel que n'en produisent collectivement que 3 à 4 litres. Deux raisons principales expliquent ceci:

La membrane de filtration du glomérule est infiniment plus perméable à l'eau et aux solutés que ne le sont les autres lits capillaires; la pression sanguine est beaucoup plus élevée dans le glomérule que dans les autres lits capillaires.

Le taux de filtration glomérulaire (TFG), c'est-à-dire la quantité de liquide et de soluté qui traverse le filtre glomérulaire dans un temps donné, est la résultante vectorielle de plusieurs forces physiologiques (revue dans Dworkin et Brenner, 1992).

Le taux de filtration glomérulaire pour le réseau capillaire d'un néphron individuel (TFGNI) est donné par l'équation suivante:

$$\begin{aligned} \text{NITFG} &= K_f \cdot P_{nf} \\ &= K_f \cdot (\Delta P - \Delta \Pi) \\ &= K_f \cdot S \cdot (P_c - P_\tau) - (\Pi_c - \Pi_\tau) \text{ où} \end{aligned}$$

K_f est le coefficient de filtration et

P_{nf} est la pression nette de filtration

La pression nette de filtration (P_{nf}) est égale à la différence entre la moyenne du gradient de pressions hydrostatiques transcapillaire (ΔP) et la moyenne du gradient

de pression oncotique ($\Delta\Pi$).

ΔP (moyenne du gradient de pression hydrostatique transcapillaire) est égale à la différence entre la pression hydrostatique moyenne à l'intérieur des capillaires glomérulaires (artérielle) (P_c) et la pression hydrostatique moyenne capsulaire (capsule de Bowman, P_τ). La pression hydrostatique à l'intérieure du glomérule est très élevée. Plus de 25 % du rendement cardiaque passe au travers des capillaires glomérulaires. La pression hydrostatique intraglomérulaire est d'environ 55 mmHg chez un animal normal (Arendshorst et Gottschalk, 1985; Brenner et coll., 1971; Deen et coll., 1974; Ott et coll., 1976; Tonder et Aukland, 1979), elle est 3 fois plus élevée que celle mesurée dans les autres lits capillaires du corps. La pression hydrostatique capsulaire n'étant que de 15 mmHg, le ΔP est d'environ 30 mmHg chez l'humain (Brenner et coll., 1981).

$\Delta\Pi$ (moyenne du gradient de pression oncotique transcapillaire) est égale à la différence entre la pression oncotique plasmatique (Π_c) et la pression oncotique du filtrat dans la chambre capsulaire (Π_τ). La pression oncotique se dit de la pression osmotique propre des protéines dans un liquide. Du fait que la concentration des protéines à l'intérieur de la chambre capsulaire est très faible, Π_τ est négligeable et $\Delta\Pi$ est essentiellement égale à Π_c (Eisenbach et coll., 1975). Étant donné que la paroi glomérulaire restreint le passage des protéines plasmatiques vers la chambre glomérulaire, la pression oncotique intraglomérulaire (Π_c) reste toujours plus ou moins élevée. Ceci permet au plasma de garder une certaine quantité de liquide.

K_f (coefficient de filtration) est égal au produit de K (conductivité hydrostatique glomérulaire) et S (surface de filtration). Ainsi, lorsque la surface de filtration augmente, le taux de filtration glomérulaire augmente aussi (Brenner et coll., 1986). Finalement, il a été démontré que le taux de filtration glomérulaire (TFG) est directement proportionnel au débit sanguin (Q_a). La relation entre ces deux paramètres est linéaire. Cependant, si Q_a augmente au-delà d'une certaine valeur critique (plus grand que 130 ml/min.), le TFG n'augmente plus de la même façon, et diminue même avec une augmentation subséquente de Q_a . À ce moment, la pression de filtration n'est plus à l'équilibre (Brenner et coll., 1986).

En considérant toutes les variables de l'équation, la pression nette de filtration chez un adulte normal est d'environ 10 mm Hg et les taux de filtration glomérulaire sont d'environ de 120 à 125 ml/min. La pression oncotique du côté efférent (35mmHg) est plus élevée que celle du côté afférent (20 mm Hg) et la pression nette de filtration est donc plus élevée du côté afférent. Par le fait même, le filtrat se forme plus rapidement au début du glomérule (Landis et Pappenheimer, 1963).

Afin de contrer les fluctuations de la filtration glomérulaire, la pression artérielle glomérulaire est normalement soumise à des mécanismes de régulation intrinsèques et extrinsèques.

Régulation intrinsèque

Ce phénomène d'autorégulation a été démontré sur des préparations de rein isolé et dénervé (Forster et Maes, 1947; Navar, 1978; Robertson et coll., 1972). Ces études ont démontré que malgré d'importantes baisses de pression, le débit sanguin ainsi que le taux de filtration glomérulaire demeuraient constants. En ajustant eux même la quantité de sang qui les traverse, les reins peuvent conserver un débit de filtration glomérulaire constant en dépit des fluctuations de la pression artérielle systémique. Il semble que l'autorégulation rénale repose sur deux mécanismes différents: d'une part, il existe un mécanisme myogène qui réagit aux variations de pression dans le réseau artériel des reins, et d'une autre part, le mécanisme de rétroaction tubulo-glomérulaire qui s'amorce avec les changements détectés par l'appareil juxta-glomérulaire.

Le mécanisme myogène est basé sur la capacité des muscles lisses vasculaires (artériole afférente) à se contracter sous l'effet de l'étirement. L'élévation de la pression artérielle systémique cause donc une constriction des artérioles glomérulaires afférentes, ce qui réduit le débit sanguin dans les capillaires glomérulaires et empêche l'élévation de la pression au niveau des capillaires (Deen et coll., 1974; Steinhausen et coll., 1989). De cette façon, le taux de filtration glomérulaire peut rester stable.

Le mécanisme de rétroaction tubulo-glomérulaire est régi par les cellules de la macula densa de l'appareil juxta-glomérulaire et par le système rénine-

angiotensine. Ces cellules sont sensibles à l'écoulement du filtrat et aux signaux osmotiques (à base teneur en ions sodium ou en ions chlorure du filtrat) (Kato et coll., 1990; Wright et Briggs, 1979); les cellules libèrent alors des substances chimiques qui provoquent une intense vasodilatation des artérioles glomérulaires afférentes et, par conséquent, une augmentation de la filtration glomérulaire. De plus, il apparaît que les différentes cellules du glomérule sont capables de synthétiser *de novo* une grande variété de substances qui ont des propriétés vasoactives et influencent ainsi le taux de filtration glomérulaire. Comme il a déjà été mentionné plus haut, les cellules mésangiales semblent aussi avoir des propriétés contractiles et influencer la pression intraglomérulaire et la filtration glomérulaire.

Régulation extrinsèque

Une grande variété de récepteurs pour des substances hormonales a été identifiée dans le glomérule tel que les récepteurs pour l'histamine, la dopamine, la norépinéphrine, l'hormone parathyroïde et bien d'autres (Dworkin et Brenner, 1992). Il a été démontré que plusieurs de ces hormones pouvaient influencer la filtration glomérulaire.

Facteurs basés sur la taille

L'évaluation de la clairance fractionnelle de certains marqueurs exogènes a permis de démontrer que le filtre glomérulaire restreignait le passage des macromolécules

en fonction de leur taille (Petitjean et coll., 1996). La clairance d'une molécule (ou coefficient de tamisage) est en fait le rapport entre la concentration de cette molécule dans le plasma et la concentration de cette même molécule dans le filtrat. Par ailleurs, la clairance fractionnelle d'une macromolécule M est définie comme la clairance de M (C_M) divisée par le débit de filtration glomérulaire de l'eau, celui-ci étant apprécié par la clairance de l'inuline (C_{in}) (car l'inuline passe au travers du filtre glomérulaire sans aucune restriction. La concentration de l'inuline dans le plasma est donc égale à la concentration de l'inuline dans le filtrat). La clairance fractionnelle de M est donc :

$CF_M = C_M/C_{in} = [C_M \text{ (filtrat/plasma)}] \times [C_{in} \text{ (plasma/filtrat)}]$, ainsi une molécule qui a une clairance fractionnelle de 0 est complètement exclue du transport transglomérulaire, mais au contraire, si la molécule a une clairance fractionnelle de 1, celle-ci traverse la paroi glomérulaire aussi librement que l'inuline. La clairance fractionnelle est inversement proportionnelle à la taille moléculaire d'une molécule, à la vitesse du flux sanguin et à la pression artérielle glomérulaire. Par ailleurs, la clairance fractionnelle est proportionnelle à la pression oncotique artérielle ainsi qu'au coefficient de filtration glomérulaire.

La polyvinyl-pyrrolidone, les dextrans et le ficoll, sont trois macromolécules polymériques non protéiques, qui ont été largement utilisées comme marqueurs dans l'étude des propriétés sélectives de la barrière capillaire. La caractéristique principale de ces molécules est que l'on peut changer volontairement leur poids moléculaire tout en conservant leurs charges nettes, leur structure chimique ainsi

que leur conformation moléculaire. De plus, ces molécules ne sont pas réabsorbées par les tubules, ce qui permet l'analyse réelle des coefficients de tamisage de la barrière glomérulaire pour une molécule donnée. La sélectivité de taille d'une macromolécule a été ainsi étudiée en mettant en relation la clairance fractionnelle des molécules avec leur rayon moléculaire (rayon de *Einstein-Stokes*) déterminé par chromatographie sur gel (Brenner et coll., 1977). Les études de Chang et collaborateurs (Chang et coll., 1975) ont montré que les dextrans neutres qui ont une taille égale ou inférieure à 20Å, passent la paroi glomérulaire aussi librement que l'inuline. Cependant, la clairance fractionnelle du dextran neutre diminue progressivement avec une augmentation subséquente du rayon moléculaire. De plus, les dextrans ayant un rayon supérieur à 42Å, ne passent plus la barrière glomérulaire, et leur clairance fractionnelle est égale à 0. Des études faites chez le chien et le chat ont donné des résultats similaires avec le dextran ainsi que d'autres marqueurs tel que la polyvinyl-pirrolidone, un autre polymère neutre (Arturson et coll., 1971; Hardwicke et coll., 1970; Gasse, 1973; Lambert et coll., 1975;). En terme biophysique, le transport de macromolécules à travers la barrière capillaire glomérulaire, peut être décrit par un modèle hydrodynamique de transport à travers des pores à contenu aqueux (Deen et coll., 1985; Chang et coll., 1975a). D'après les physiologistes (Chang et coll., 1975a; Chang et coll., 1975b), le diamètre de ces pores correspondrait à 50Å. Il est important de noter que ce modèle représente une description "fonctionnelle" de la barrière de filtration. En raison des limitations actuelles des techniques de microscopie électronique, il n'est qu'exceptionnellement possible de mettre en évidence une correspondance anatomique à ces pores. À cause de sa structure, le

réseau tridimensionnel collagénique est en partie responsable de la sélectivité de taille au niveau de la membrane basale glomérulaire (Ichiyasu et Makino, 1988; Makino, 1982, Makino et coll., 1993; Moriya et coll., 1995). En 1982, Makino et collaborateurs ont démontré à l'aide d'une technique de coloration négative en microscopie électronique sans étape de fixation, la présence de pores exhibant un diamètre de 3 nm (30Å) au niveau de la MBG. Ces pores (mailles) ont une taille légèrement inférieure à celle de l'albumine (Makino, 1982). D'autres chercheurs (par des techniques de cryo-fixation), ont plutôt trouvé chez le rat des pores avec un diamètre de 22 nm (Morya et coll., 1993a; Batsford et coll., 1987). Ces données divergentes peuvent être expliquées par le fait que les chercheurs n'ont pas utilisé les mêmes techniques de préparation des tissus. Bien que la taille des mailles du réseau protéique de la MBG ne soit pas encore déterminée, il est bien accepté que la MBG joue un rôle important dans la sélectivité de taille. En utilisant une approche morphologique et des traceurs comme la ferritine de plus grande taille (60Å), différents chercheurs ont très bien démontré que la restriction des macromolécules par rapport à leur taille, s'effectue surtout au niveau de la membrane basale glomérulaire et principalement au niveau de la *lamina rare interna* (Farquhar et coll., 1961). Les fenestrations des cellules endothéliales sont suffisamment grandes pour laisser passer tous les éléments acellulaires du sang (70 à 100 nm de diamètre) (Jørgensen et Bentzon, 1968).

Facteurs basés sur la charge

Les facteurs hémodynamiques ainsi que la taille des macromolécules ne sont pas les seuls facteurs à influencer le passage des macromolécules au travers la barrière glomérulaire. Il est maintenant clair que les charges isoélectriques des macromolécules et de la paroi glomérulaire influencent aussi la sélectivité du passage transglomérulaire des macromolécules. La clairance fractionnelle de l'albumine (estimée à partir de prélèvements de filtrat au niveau de la capsule de Bowman) est significativement inférieure aux valeurs correspondantes pour le dextran neutre qui a pourtant le même rayon moléculaire que l'albumine (environ 36Å). À pH physiologique, la barrière glomérulaire qui est chargée négativement, restreint le passage des molécules polyanioniques comme l'albumine. Chang et ses collaborateurs (Chang et coll., 1975c), ont démontré le rôle des charges moléculaires en étudiant les propriétés filtrantes (clairance fractionnelle) de trois types de dextrans ayant le même rayon moléculaire mais chargés différemment. On peut voir sur le graphique de la figure 3 que la clairance fractionnelle des dextrans augmente lorsque les molécules sont plus cationiques (positives). En effet, la clairance fractionnelle est beaucoup plus élevée pour les dextrans cationiques (DEAE) que pour les dextrans sulfates ou neutres. De plus, l'effet de la charge est moins important pour les macromolécules qui ont un rayon supérieur à 42Å ou inférieur à 22Å (Bohrer et coll., 1978). Des relations similaires entre la charge et la clairance fractionnelle ont été obtenues pour l'albumine (Purtell et coll., 1979) et pour la HRP (*horse-radish peroxidase*) (Rennke et coll., 1978). Ces résultats suggèrent qu'il se produit des d'interactions électrostatiques entre les

molécules circulantes chargées positivement et les sites anioniques de la paroi glomérulaire.

Les études morphologiques permettent de localiser des sites anioniques au niveau de tous les constituants de la paroi glomérulaire. En effet, on associe les groupes sialiques des hétéropolysaccharides au niveau des cellules endothéliales et épithéliales et les groupes carboxyles des glycopeptides collagéniques et non collagéniques ainsi que les groupe sulfates des glycosaminoglycanes au niveau de la MBG (Blau et Haas, 1973; Caulfield et Farquhar, 1976, Kanwar et Farquhar, 1979a; Latta et coll., 1975; Charest et Roth, 1985; Michael et coll., 1970; Mohos et coll., 1969; Seiler et coll., 1975; Seiler et coll., 1977). Tous ces sites anioniques ont un rôle à jouer au niveau de la sélectivité de la paroi glomérulaire.

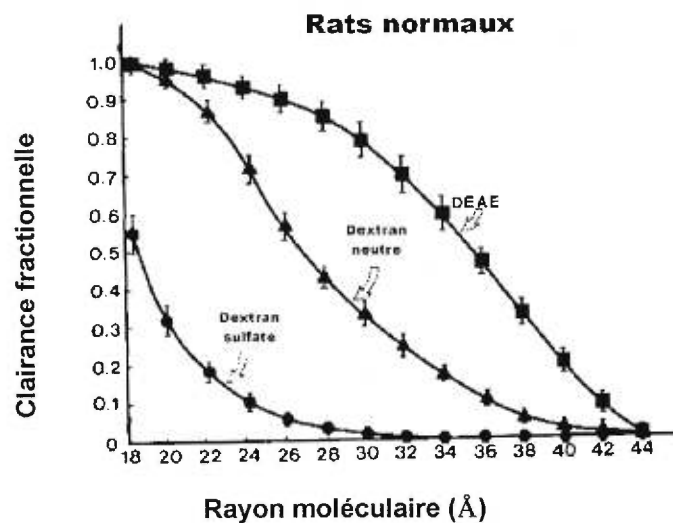


Figure 3 : Graphique de la clairance fractionnelle du diéthylaminoéthyl dextran (DEAE), du dextran neutre et du dextran sulfate anionique en fonction du rayon moléculaire (Å) chez des rats normaux. La clairance fractionnelle est plus élevée pour le dextran sulfate anionique que pour le dextran neutre et que pour le dextran DEAE. (Modifiée de Bohrer et coll., 1978.)

Depuis longtemps et encore aujourd'hui, les scientifiques essaient de déterminer la contribution des différents sites anioniques de la paroi glomérulaire dans le passage transglomérulaire des macromolécules. Cependant, les résultats obtenus par différentes études morphologiques soulèvent certaines confusions. En utilisant des dextrans neutres comme traceurs morphologiques, Caulfield et Farquhar concluent que la membrane basale glomérulaire est la principale barrière qui restreint le passage des macromolécules (Caulfield et Farquhar, 1974). Par ailleurs, d'autres morphologistes qui ont utilisé des traceurs cationiques denses aux électrons tel que la myelopéroxydase (Graham et Karnovsky, 1966), la lactopéroxydase (Graham et Kellermeyer, 1968), ou la catalase (Venkatachalam et coll., 1970), suggèrent plutôt que la paroi glomérulaire possède une double barrière de charges. Ceux-ci soutiennent que les charges présentes au niveau de la MBG contribuent grossièrement à la sélectivité de la paroi glomérulaire et qu'une sélectivité plus fine s'effectue au niveau des fentes de filtration. Plus tard, certains chercheurs (Rennke et coll., 1975; Rennke et Venkatachalam, 1978) ont perfusé le rein *in situ* avec une fraction de ferritines de différents pI mais de même taille (60Å). Les résultats de cette étude démontrent que les charges de la MBG influencent de façon très importante le passage des molécules cationiques. Récemment, Ghitescu et coll., ont démontré par immunocytochimie en microscopie électronique que l'albumine cationique marquait les sites anioniques présents au niveau de la *rara interna* et *externa* alors que l'albumine anionique et l'albumine neutre étaient surtout distribuées du côté endothélial de la MBG (Ghitescu et coll., 1992). Ces résultats corroborent ceux de Cotran et coll., et démontrent l'effet des charges négatives fixes de la MBG sur le passage des macromolécules.

D'autres études confirment ces conclusions. Kanwar et ses collègues ont démontré que la perméabilité de la barrière glomérulaire pour la ferritine anionique augmentait lorsqu'ils effectuaient une digestion enzymatique des héparanes sulfates avec des héparinases (Kanwar et coll., 1980). Plus récemment, van den Born et son équipe ont démontré de façon non équivoque l'importance du rôle sélectif des héparanes sulfates. Ils observent que l'injection intraveineuse d'anticorps spécifiques contre les héparanes sulfates, induit l'albuminurie chez des rats normoglycémiques. De plus, cette albuminurie est rétablie lorsque ces anticorps sont lavés (van den Born et coll., 1992). Par ailleurs, des observations récentes démontrent que la perméabilité de la barrière glomérulaire pour la ferritine anionique est aussi augmentée lorsque le rein est perfusé avec la neuraminidase (provoque le détachement des podocytes) (Kanwar et Rosenzweig, 1982). D'autres études démontrent aussi le rôle sélectif des charges anioniques au niveau des fentes de filtration dans la sélectivité du passage des macromolécules cationiques (Daniels et Hostetter, 1990; Daniels, 1993; Laurens et coll., 1995; Fujigaki et coll., 1998) et corroborent les conclusions de Graham et Karnovsky (1966). Finalement, il semble que les charges anioniques présentes au niveau des cellules endothéliales, contribuent de façon importante à la restriction des macromolécules à travers la barrière glomérulaire (Blau et Haas, 1973; Latta et coll., 1975; Mohos, 1969; Lassen, 1970).

En résumé, grâce aux nombreuses études, il est de plus en plus clair que la paroi glomérulaire possède plus d'un site sélectif pour les charges. En effet, il semble

que le passage des polyanions circulants soit déjà très fortement gêné par les charges négatives présentes au niveau de l'endothélium vasculaire. Cette restriction endothéliale permettrait d'éviter que de grosses molécules, arrêtées plus loin par la membrane basale, ne s'accumulent dans la paroi capillaire et produisent ainsi un phénomène de colmatage. D'un autre côté, il est clair que les charges présentes au niveau de la membrane basale glomérulaire jouent un rôle indéniable dans la sélectivité des macromolécules neutres et anioniques. Finalement, il y a de plus en plus d'évidences qui suggèrent que les charges négatives au niveau des fentes de filtration influencent le passage transglomérulaire des macromolécules de petites tailles et très cationiques.

Facteurs basés sur la conformation moléculaire des macromolécules

Les courbes de tamisage des protéines anioniques et des dextrans sulfate sont assez voisines. Cependant, le coefficient de tamisage de l'albumine est plus bas que celui du dextran sulfate de même taille. Pour expliquer ceci, des chercheurs ont suggéré que la conformation des macromolécules pouvait influencer leur comportement lors du passage au travers la paroi glomérulaire. Cette supposition découle des études de Bohrer et collaborateurs. Ces derniers ont comparé les valeurs de clairance fractionnelle du dextran neutre (rouleau flexible en solution) avec celles du ficoll (polymère sphérique et rigide). Les résultats de cette étude démontrent que la clairance fractionnelle du ficoll est toujours inférieure à celle du

dextran neutre. D'après ces chercheurs, l'albumine se comporte comme une sphère rigide, tel le ficoll (Bohrer et coll., 1979). D'autres chercheurs (Rennke et Venkatachalam, 1979) ont fait le même type d'analyse, mais en comparant cette fois la clairance fractionnelle de la HRP native, une protéine globulaire ayant un rayon de 28Å, avec celle du dextran neutre de dimension similaire. Ils remarquent que la clairance fractionnelle de la protéine globulaire (HRP) était significativement inférieure celle du dextran et concluent que l'augmentation du transport transglomérulaire du dextran est reliée au mouvement de reptation des branches flexibles de la molécule. Ces conclusions ont toutefois été très critiquées. D'autres études sont nécessaires afin de déterminer la contribution réelle de la forme moléculaire lors du transport transglomérulaire des protéines.

DIABÈTE

Le diabète mellitus est un désordre métabolique relié à l'absence ou à l'inefficacité de l'insuline. La défaillance métabolique de l'insuline induit une insuffisance au niveau de l'absorption cellulaire du glucose, ce qui se traduit dans la plus part des cas, par une augmentation importante de la glycémie. L'hyperglycémie provoque plusieurs lésions au niveau de la microvascularisation ce qui entraîne le développement de plusieurs complications incluant la microangiopathie, la néphropathie, la rétinopathie et la neuropathie (Nathan, 1993). Des altérations au niveau des gros vaisseaux tel que l'artériosclérose ont aussi été décrites. Nous

verrons plus loin que le glucose est un agent important dans le développement des lésions vasculaires au cours du diabète.

Il existe deux grandes formes de diabète mellitus, le diabète de type I et de type II (Bennett, 1983). Le diabète de type I aussi appelé *diabète insulino-dépendant* (DID), apparaît souvent avant l'âge de 15 ans et résulte de la destruction des cellules bêtas du pancréas suite à une réponse auto-immune. Ainsi, le diabète de type I se traduit par une absence d'insuline. Cette forme compte pour au moins 10 à 20 % des cas de diabète mellitus. La cause de cette forme de diabète semble être liée d'un côté à la susceptibilité des gènes liés au complexe d'histocompatibilité de classe II (ces gènes prédisposeraient l'individu au développement subséquent d'une réponse auto-immunitaire des cellules bêtas) et d'un autre côté à certains facteurs environnementaux nocifs tel que certains virus et toxines (Muir et coll., 1992). Le diabète de type II, aussi appelé *diabète non-insulino-dépendant* (DNID), apparaît plutôt vers l'âge de 40 ans, et compte pour plus de 80% des cas de diabète. Il semble que l'hérédité soit un facteur pathogénique important du diabète de type II, puisque la probabilité d'incidence de la maladie entre deux jumeaux est de 90% (Yki-Järvinen, 1994). L'obésité semble aussi être liée à cette forme de diabète. Le DNID est caractérisé par un dysfonctionnement dans la sécrétion de l'insuline et par des anomalies au niveau des récepteurs membranaires à l'insuline. Les patients qui souffrent de cette forme de diabète, présentent très souvent une résistance cellulaire à l'insuline.

NÉPHROPATHIE DIABÉTIQUE

La néphropathie diabétique est une des causes majeures de morbidité et de décès chez les sujets diabétiques. L'incidence à développer ce type de complication peut atteindre jusqu'à 50% chez les patients DID. Les lésions diabétiques touchent tous les éléments du parenchyme rénal. Cependant, les lésions au niveau du glomérule rénal sont les plus communes et ces dernières sont associées de façon clinique avec la protéinurie.

Altérations structurales au niveau du glomérule

Lésions glomérulaires

Les lésions glomérulaires avancées peuvent être observées à faible grossissement en microscopie optique. La glomérulose nodulaire décrite par Kimmelstriel et Wilson en 1936 (Kimmelstriel et Wilson, 1936; Herf et coll., 1979) est une lésion glomérulaire spécifique au diabète, bien qu'elle ait été aussi décrite dans des amyloses et dans certaines glomérulonéphrites dites lobulaires. Cette lésion glomérulaire est caractérisée par la présence de nodules acellulaires amorphes, de forme ovale et lamellaire (nodule de Kimmelstriel-Wilson). Ces derniers peuvent contenir à l'occasion des débris nucléaires et sont positifs par la coloration de PAS. Les nodules ont tendance à se développer à la périphérie du glomérule repoussant

ainsi les capillaires. Le développement excessif des nodules, transforme le glomérule en une masse non-fonctionnelle. La glomérulosclérose diffuse est une lésion glomérulaire mineure qui se produit au niveau du mésangium. Cette dernière précède ou accompagne la glomérulosclérose nodulaire. Elle est caractérisée par l'accumulation de substance membranoïde. Ces substances sont aussi positives par la coloration de PAS. Le développement de cette lésion aboutit à une hyalinisation du glomérule. En microscopie optique on distingue, dans des cas très avancés, des dépôts capsulaires. Ces dépôts sont de petites masses rondes éosinophiles situées au niveau du feuillet pariétal de la capsule de Bowman. Finalement, entre les cellules endothéliales et la membrane basale glomérulaire, il se crée à l'occasion des lésions appelées *fibrine cap* en raison de leur affinité tinctoriale. Ces dernières sont aussi présentes dans d'autres maladies tel que l'artériosclérose. La description des modifications fonctionnelles et structurales du glomérule au cours du diabète, provient surtout d'études effectuées au cours de la glomérulose diffuse, pour la simple raison que la pathologie devient extrêmement complexe dans des temps plus avancés et il devient alors difficile d'établir des relations structure-fonction.

L'observation ultrastructurale du rein en microscopie électronique a permis de localiser les lésions morphologiques de façon beaucoup plus précise et d'identifier plus précisément les structures atteintes au cours du diabète. En effectuant des analyses stéréologiques et morphométriques, on note une augmentation importante de la taille de la matrice mésangiale à des temps précoces de la maladie. Cependant, la quantité de cellules mésangiales ne semble pas être augmentée

(Dachs et coll., 1964). Osterby et coll. ont démontré qu'après 3 à 5 ans de diabète, l'épaisseur de la MBG était augmentée de façon significative. L'épaississement de la MBG progresse avec la durée de la maladie (Østerby, 1975; Østerby et Gundersen, 1980; Østerby et coll., 1998). Chez le modèle de rat diabétique (par l'administration de la streptozotocine), l'expansion du mésangium se produit après deux semaines de diabète (Wehner et Petri, 1983), alors que l'épaississement de la MBG a été observé après 6 mois d'hyperglycémie (Rash, 1979a; Rash et Dørup, 1997). D'autres chercheurs ont aussi noté un épaississement de la MBG au cours du diabète (Hirose et coll., 1982; Bendayan et coll., 1986).

Modifications biochimiques de la MBG

Il y a une corrélation entre l'épaississement de la MBG, et la présence de changements biochimiques dans la composition des acides aminés et des sucres au niveau de la MBG (Beisswenger et Spiro, 1970; 1973; 1976; Spiro, 1976). Les macromolécules contenant des carbohydrates sont préférentiellement altérées au cours du diabète. En effet, la quantité de glycine, d'hydroxylysine, d'hydroxyproline ainsi que le nombre de résidus mono- et di-saccharidiques liés de façon covalente à l'hydroxylysine, sont augmentés au niveau de la MBG au cours du diabète. Inversement, les quantités de valine et de tyrosine ainsi que le nombre de résidus lysine diminuent significativement. Ces changements au niveau de la MBG sont accompagnés par l'augmentation de la quantité de glycosyltransférase ainsi que de

lysyl-hydroxylase au niveau cellulaire (Spiro et Spiro, 1971; Khalifa et Cohen, 1975). Des études cytochimiques chez le rein de rat utilisant des complexes lectines-or qui reconnaissent de façon spécifique des groupements carbohydrates de certains glycoconjugués, ont révélé des changements dans la quantité et dans la distribution de ces composants au niveau de la MBG des animaux diabétiques. En effet, le nombre des résidus N-acétylgalactosamine et fucose reconnus respectivement par les lectines HPL-or et UEA-or, ainsi que d'autres sucres reconnus par les lectines RCA-or, WGA/ovomucoïde-or et UEA-or, diminuent au niveau de la MBG au cours du diabète (Bendayan et coll., 1990). Ces changements biochimiques reflètent une accumulation (Karttunen et coll., 1986; Mohan et coll., 1990) ou une diminution (Shimomura et Spiro, 1987; Parthasarathy et Spiro, 1982; Rohrbach et coll., 1982) subséquente de certains composants de matrice extracellulaire, au cours de la maladie. La modification de la quantité de protéines extracellulaires modifie par le fait même la distribution ultrastructurale des différentes glycoprotéines de la MBG (Bendayan, 1985; Desjardins et Bendayan, 1990).

Des méthodes immunocytochimiques en microscopie électronique ainsi que des quantifications immuno-biochimiques, ont permis d'analyser et de quantifier de façon individuelle le degré d'expression des protéines structurales du glomérule afin d'identifier la nature des modifications ultrastructurales. Au niveau de la MBG de patients diabétiques qui présentaient seulement certaines lésions morphologiques mineures (glomérulosclérose diffuse), les taux de collagène de type IV $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 4$, de laminine et de fibronectine sont augmentés alors que le taux perlecan

est diminué (Kim et coll., 1991; Mohan et coll., 1990; Shimomura et Spiro, 1987). Dernièrement Regoli et coll. (Regoli et coll., 1998) ont aussi démontré une augmentation significative de la quantité de collagène VI dans la membrane basale glomérulaire et plus particulièrement dans le mésangium chez les animaux diabétiques avancés, étant donné que le collagène de type IV est prépondérant au niveau des nodules de Kimmelstiel-Wilson (Nerlich et coll., 1994). Plus récemment, d'autres études basées sur des méthodes de *Northern-blot* et d'hybridation *in situ* ont démontré que les quantités d'ARN messagers codant pour les sous-unités $\alpha 1$ du collagène de type IV et pour les sous-unités B1 et B2 de la laminine, augmentaient significativement après quelques jours suivant l'induction du diabète chez les rats (Park et coll., 1997; Fukui et coll., 1992).

La quantité d'ARNm codant pour le perlecan est aussi diminuée au cours du diabète (Fukui et coll., 1992). Cependant, plusieurs chercheurs ne détectent pas nécessairement une diminution de la protéine dans le glomérule au cours du diabète. En effet, en utilisant des techniques d'immunofluorescence sur des biopsies de patients souffrant de néphropathie diabétique, certains chercheurs notent une réduction dans l'intensité du marquage pour les héparanes sulfates, sans toutefois observer une diminution de la densité de marquage pour le perlecan (Tamsma et coll., 1994). Ces résultats semblent indiquer que les conditions diabétiques interfèrent avec la synthèse du perlecan, possiblement en limitant l'addition d'héparane sulfate sur la structure protéique du perlecan (Olgemöller et coll., 1992). Finalement, la réduction même de la quantité d'héparane sulfate au niveau de la membrane basale est encore controversée aujourd'hui. Woodrow et

ses collègues n'observent aucune diminution d'héparane sulfate dans la MBG de patients diabétiques (Woodrow et coll., 1992). Par ailleurs, certaines études ont montré une réduction relative d'héparane sulfate. D'après ces études, la quantité d'héparane sulfate serait "diluée" lors de la déposition excessive des autres composants de la matrice extracellulaires (van den Born et coll., 1995a; Groggel et coll., 1988). De plus, d'autres études montrent une diminution d'héparane sulfate qui semble être absolue. Kanwar a démontré par autoradiographie et par analyse biochimique que la synthèse de prototéoglycanes diminuait de 40% chez les rats diabétiques comparativement aux rats normaux (Kanwar et coll., 1983). Des résultats similaires ont été rapportés chez la souris diabétique (Rohrbach et coll., 1983). De plus, par méthode biochimique, Parthasarathy et Spiro ont noté une diminution significative de la quantité d'héparane sulfate dans la MBG de patients diabétiques (Parthasarathy et Spiro, 1982). À l'aide d'analyses ultrastructurales, d'autres études ont aussi démontré une diminution dans la quantité de marquage d'héparane sulfate au niveau de la *lamina rara interna* de la MBG chez des rats diabétiques (Desjardins et Bendayan, 1990; Vernier et coll., 1992), et au niveau de la MBG chez le patient diabétique (Tamsma et coll., 1994).

Modifications moléculaires et architecturales de la MBG

La distribution de certaines protéines structurales de la MBG est aussi modifiée au cours du diabète. Desjardins et Bendayan ont démontré par immunocytochimie

ultrastructurale combinée à l'analyse morphométrique, que la distribution du marquage spécifique pour le collagène de type IV qui se trouve principalement au niveau de la *lamina densa* chez l'animal normal, est déplacée de façon significative du côté subendothéliale de la MBG chez l'animal diabétique (Bendayan, 1985; Desjardins et Bendayan, 1990). Par ailleurs, Desjardins et Bendayan n'ont observé aucune modification dans la distribution du marquage de la laminine, de l'entactine ainsi que des protéoglycanes héparanes sulfates chez ces mêmes animaux (Desjardins et Bendayan, 1990). Toutes les modifications structurales au niveau de la MBG reflètent les changements dans la structure tridimensionnelle de la MBG. Dernièrement, en utilisant une approche combinant les techniques de cryo-fixation, de cryo-décapage et d'immunocytochimie en microscopie électronique, Inoue et Bendayan ont observé une altération au niveau de l'organisation ultrastructurale des composants de la MBG au cours du diabète (Inoue et Bendayan, 1995). Le réseau de filaments denses au niveau de la partie subépithéliale de la MBG chez l'animal normal, fait place chez l'animal diabétique, à un réseau de filaments diffus, caractérisés par la présence de filaments minces et de matériels granulaires. De plus, la partie subendothéliale de la MBG chez l'animal diabétique est caractérisée par l'accumulation de collagène de type IV et par la déposition de basotubules (filament de 12 nm) ainsi que par l'apparition d'espaces vides.

Modifications cellulaires

Le phénotype des cellules glomérulaires est modifié au cours du diabète. On observe entre autre une augmentation de la synthèse d' α -actin au niveau des cellules mésangiales. Ces dernières reprennent le phénotype typique des cellules musculaires lisses (Alpers et coll., 1992). Certains chercheurs n'ont cependant pas pu observer ce type de transformation (Schleicher et coll., 1996). Le phénotype des cellules épithéliales, normal au début de la néphropathie diabétique, subit aussi certaines modifications au cours du diabète. Ces modifications sont caractérisées par l'effacement des pédicelles dû au fusionnement des podocytes. Par la suite, les podocytes dégénèrent et se détachent de la MBG (Bjørn et coll., 1995; Cohen et coll., 1977).

Ces modifications phénotypiques sont accompagnées par des changements au niveau de l'expression de certaines protéines impliquées dans la régulation de la synthèse ou de la dégradation des composants matriciels. En utilisant un anticorps spécifique contre la sous-unité $\alpha 3$ de l'intégrine $\alpha_3\beta_1$, Regoli et Bendayan ont montré une diminution significative de la présence de cette intégrine au niveau de la membrane plasmique des podocytes faisant face à la membrane basale glomérulaire chez des rats diabétiques (Regoli et Bendayan, 1997). Le rôle de cette intégrine au niveau des interactions cellule-matrice, a été très étudiée. Cette intégrine est un récepteur connu pour la laminine (Gehlsen et coll., 1989; Kerjaschki et coll., 1989), le collagène (Wayner et Carter, 1987; Miles et coll., 1995), la fibronectine (Miles et coll., 1995), l'entactine (Dedhar et coll., 1992) ainsi que pour

l'épiligrine (Carter et coll., 1991). Ainsi, étant donné que les podocytes sont impliqués dans la synthèse de la matrice extracellulaire de la MBG, la réduction de l'expression de $\alpha_3\text{B}_1$ au niveau de ces cellules pourrait influencer la déposition normale des composants de la matrice extracellulaire (Regoli et Bendayan, 1997). L'altération au niveau de l'expression des intégrines au cours du diabète n'est pas si simple. En effet, bien que Regoli et Bendayan aient démontré une diminution de l'intégrine $\alpha_3\text{B}_1$, ils ont aussi démontré récemment, qu'il y avait par ailleurs une augmentation de l'expression de la sous-unité β_1 au niveau du glomérule au cours du diabète (Regoli et Bendayan, 1999). Il est bien connu que la sous-unité β_1 des intégrines est impliquée dans la signalisation intracellulaire via son interaction avec la protéine kinase FAK (Hanks et coll., 1992; Hanks et coll., 1997). Par le fait même, Regoli et Bendayan ont démontré qu'il y avait une réduction importante de l'association entre la sous-unité β_1 de l'intégrine et FAK au cours du diabète. Ces résultats suggèrent fortement qu'il se produit une altération au niveau de la transduction des signaux intracellulaires (signalisation *outside-in*) au cours du diabète. Dans ce même ordre d'idée, des chercheurs ont montré qu'il y avait une augmentation importante de l'expression du facteur de transcription TGF- β au niveau des cellules glomérulaires au cours du diabète (Park et coll., 1997; Yamamoto et coll., 1993; Yang et coll., 1995). L'augmentation de TGF- β est accompagnée par l'augmentation de l'expression des oncogènes c-fos et c-jun (Kreisberg et coll., 1994). Le rôle du TGF- β dans la formation de la matrice extracellulaire a été démontré par plusieurs chercheurs (Border et coll., 1990; Border et coll., 1992; Yamamoto et coll., 1993). Il y a probablement un lien entre l'altération de l'expression du TGF- β et l'accumulation de matrice extracellulaire au

cours du diabète. L'expression de certaines enzymes impliquées dans la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire est aussi altérée au niveau des cellules glomérulaires au cours du diabète. Schleicher et coll. ont montré qu'il y avait une augmentation importante de l'expression de la prolylhydroxylase au niveau des cellules mésangiales. Cette enzyme est impliquée dans la néosynthèse du collagène (Schleicher et coll., 1996). De plus, des groupes de chercheurs américains et japonais ont démontré que très tôt au cours de la maladie, la quantité de ARNm codant pour la métalloprotéinase-2 et 3 diminue au niveau des cellules glomérulaires. Contrairement, la quantité de ARNm codant pour l'inhibiteur des métalloprotéinases-1 est augmentée (Wu et coll., 1997). Ces résultats sont donc consistants avec les résultats qui montrent l'accumulation de matrices extracellulaires au niveau de la membrane basale glomérulaire et du mésangium au cours de la néphropathie diabétique.

Altérations fonctionnelles au niveau de la MBG

Au cours du diabète, plusieurs altérations fonctionnelles accompagnent les modifications structurales de la MBG. Au début de l'évolution de la maladie, l'hyperfiltration glomérulaire est associée à l'hypertrophie rénale. Par la suite, la protéinurie s'installe. Habituellement, la protéinurie accompagne les modifications structurales de la membrane basales glomérulaire. Si la maladie persiste, on observe alors une réduction importante de la filtration glomérulaire, et dans certain

cas une insuffisance rénale qui est dans la plus part des cas fatale pour l'individu. La protéinurie est la manifestation la plus commune des altérations fonctionnelles du rein au cours du diabète. Hormis de rares exceptions, l'origine des protéines dans l'urine est plasmatique. Depuis 20 ans, les connaissances concernant les mécanismes impliqués dans le développement de la protéinurie ont beaucoup progressé grâce à l'affinement des techniques expérimentales et à l'émergence de nouveaux concepts. Parallèlement, l'évolution des moyens permettant de caractériser les protéinuries, a permis leur dépistage précoce. En effet, au début de la maladie, il est possible de détecter une microprotéinurie (très faibles quantités de protéines dans l'urine d'environ 30 à 300 mg/24 heures). La relation entre la microprotéinurie et les modifications structurales au cours du diabète n'est pas encore établie. Aucune corrélation n'a encore été faite entre l'altération fonctionnelle et l'épaississement de la MBG. Il y a beaucoup d'évidences qui suggèrent que l'origine de la microprotéinurie est principalement reliée à une perte de la fonction glomérulaire plutôt qu'à une altération tubulaire. En effet, des études de microponctions démontrent que l'albuminurie (perte de l'albumine), se produit bien avant la saturation au niveau de la réabsorption tubulaire (Park et Maack, 1984). De plus, l'excrétion excessive de l'albumine au cours du diabète, n'est pas accompagnée d'une excrétion de la β -2-microglobuline. Cette dernière est une petite protéine dont le poids moléculaire ne dépasse pas 20 kDa. Comme l'inuline, la β -2-microglobuline est normalement filtrée à travers la barrière glomérulaire sans aucune restriction. Cependant elle est complètement réabsorbée par le tubule proximal. Ainsi, le taux d'excrétion de cette protéine reflète le degré de réabsorption tubulaire. L'excrétion de l'albumine dans l'urine n'est donc pas due à

une insuffisance de la réabsorption tubulaire, étant donné l'absence de beta-2 microglobuline dans l'urine de sujets diabétiques (Viberti et coll., 1979; Vittinghus et Mogensen, 1982). L'altération de la perméabilité glomérulaire au cours du diabète est concomitante aux modifications qui se produisent au niveau des propriétés sélectives de la paroi glomérulaire. Dans la suite de cette introduction, nous allons donc faire un survol des modifications qui se produisent au niveau des propriétés sélectives de la paroi glomérulaire au cours du diabète.

La perte de la perméabilité sélective de la paroi glomérulaire au cours du diabète expérimental a été démontrée de façon très élégante par immunocytochimie en microscopie électronique (Bendayan et coll., 1986). Chez l'animal normal, l'albumine endogène est principalement concentrée du côté subendothélial de la membrane basale glomérulaire. Ainsi, dans des conditions normales, l'albumine est retenue du côté subendothélial de la MBG et ne traverse pas la barrière glomérulaire. Par ailleurs, chez l'animal diabétique depuis un an, l'albumine sérique n'est plus retenue du côté subendothélial mais devient plutôt répartie de façon uniforme au travers toute l'épaisseur de la membrane basale. Dans cette même étude, Bendayan et coll. montrent que l'épaisseur de la membrane basale chez les animaux diabétiques est supérieure à celle des animaux normoglycémiques. Ces résultats ont été confirmés par des analyses morphométriques. L'altération de la fonction glomérulaire au cours du diabète est donc concomitante aux modifications structurales de la MBG. Pour la première fois, ces chercheurs démontraient morphologiquement la perte de la perméabilité de la paroi glomérulaire et le passage de l'albumine au travers la MBG au cours du diabète. Par la suite, des

résultats similaires ont été obtenus pour les immunoglobulines endogènes (IgG) (Desjardins et Bendayan, 1989). Ces études ont amené les chercheurs à se questionner sur les causes et les mécanismes pouvant être responsables de l'altération fonctionnelle de la paroi glomérulaire au cours du diabète. En fait, en faisant un tour rapide de la littérature, on s'aperçoit que tous les déterminants définissant la perméabilité de la paroi glomérulaire, sont modifiés dans des étapes plus ou moins avancées du diabète.

Modifications des propriétés sélectives de la MBG basées sur la taille

Myers et ses collègues ont démontré que chez des patients diabétiques avancés, la clairance fractionnelle est très élevée pour les molécules neutres de grandes tailles (supérieures à 46Å) (Myers et coll., 1982). La propriété sélective de la MBG basée sur la taille est donc modifiée au niveau de la GBM. D'après eux, cette altération est associée à l'apparition de pores non-sélectifs au niveau de la paroi glomérulaire. Par ailleurs, ces conclusions ne sont que théoriques, car les seules bases anatomiques qui peuvent expliquer pour le moment la modification de la propriété sélective de la taille au niveau de la MBG, sont les changements ultrastructuraux détectés au niveau de la paroi glomérulaire par approches morphologiques (Inoue et Bendayan, 1995; Moriya et coll., 1993b).

Modifications des propriétés sélectives basées sur les charges

Plusieurs chercheurs essaient d'établir la relation entre la diminution de la quantité de charges négatives au niveau de la paroi glomérulaire et l'altération fonctionnelle du glomérule au cours du diabète. Certains suggèrent que la diminution de la quantité de charges au niveau de la MBG chez des patients diabétiques est directement reliée à la diminution d'héparanes sulfates (van den Born, 1995b; Moriya, 1993b) ainsi qu'à la diminution des acides sialiques (Westberg et Michael, 1973; Cruz et Moreau-Lalande, 1978; Wahl, 1982). Toutefois, d'autres résultats s'opposent à ces conclusions. Goode et ses collaborateurs supposent plutôt que l'altération de la sélectivité basée sur les charges au cours du diabète, n'est pas due à une diminution de la quantité de charges mais à un déplacement de ces dernières à l'intérieure de la paroi glomérulaire (Goode et coll., 1995). En résumé, tous les chercheurs s'entendent sur le fait que la propriété sélective basée sur les charges est modifiée au cours du diabète, cependant la façon dont l'altération se produit est encore mal comprise.

Hyperfiltration glomérulaire

Le taux de filtration glomérulaire est augmenté de 20 à 40% avant l'apparition de la protéinurie. De plus, 25% des diabétiques ont une filtration glomérulaire supérieure à la normale pendant de nombreuses années. Comme nous l'avons mentionné

plus tôt, certains facteurs modulent le taux de filtration glomérulaire. Il s'avère que certains d'entre eux sont modifiés au cours du diabète. Il y a beaucoup d'évidences qui suggèrent que l'hyperglycémie ainsi que certains facteurs métaboliques seraient en partie impliqués dans l'augmentation de la filtration glomérulaire (Viberti et Wiseman, 1986). En effet, la normalisation de la glycémie par l'infusion de l'insuline, provoque une diminution significative la filtration glomérulaire (Mogensen, 1971a). Cependant, dans d'autres cas, la normalisation de la glycémie n'a pas eu l'effet escompté (Christiansen et coll., 1981b). Par ailleurs, d'autres études ont montré que l'injection intraveineuse de glucose chez un individu normal, tend à faire augmenter le taux de filtration glomérulaire mais à un degré moindre que l'hyperfiltration glomérulaire mesurée chez des patients diabétiques (Christiansen et coll., 1981b; Mogensen, 1971a; Brochner-Mortensen, 1973; Mogensen et coll., 1981). De plus, l'injection de glucagon, ainsi que l'hormone de croissance hypothalamique (GH) entraînent une augmentation de la filtration glomérulaire chez des sujets normaux (Parving et coll., 1980; Christiansen et coll., 1981a). Il apparaît que ces hormones sont augmentées au cours du diabète (Unger, 1976).

Le système rénine-angiotensine joue aussi un rôle au niveau de l'hyperfiltration, mais celui-ci est controversé. Christlieb a démontré que les taux de rénine avaient tendance à diminuer chez des animaux diabétiques souffrant d'hyperfiltration glomérulaire (Christlieb, 1974). del Castillo et coll., ont démontré que la glomerulopressine (augmente la filtration glomérulaire) était augmentée chez les chiens diabétiques (del Castillo et coll., 1977).

La modification des facteurs hémodynamiques au cours du diabète, semble aussi contribuer à l'hyperfiltration glomérulaire. Le flux plasmatique rénal est modérément augmenté au début du diabète. Cette augmentation est reliée à l'hypertrophie rénale, à la vasodilatation ainsi qu'à la diminution de la résistance vasculaire (Mogensen et Andersen, 1973; Christiansen et coll., 1981b). Le gradient de pression ΔP mesuré chez le rat, est aussi augmenté. La pression oncotique semble être normale chez les diabétiques (Mogensen, 1971a). Finalement, le coefficient d'ultrafiltration est augmenté très rapidement au début du diabète. Cette augmentation est reliée à l'augmentation de la surface de filtration (Hirose et coll., 1980). Il y a cependant un envers à la médaille. À un stade tardif de la maladie, la surface de filtration est diminuée en raison de l'occlusion glomérulaire et de l'expansion mésangiale (Winetz et coll., 1982). À ce stade de la maladie, la filtration glomérulaire diminue de façon importante. Finalement, bien que l'hypertension systémique ne soit pas toujours associée à la néphropathie diabétique chez l'humain chez le rat (Hostetter et coll., 1981), il semble qu'elle accélère le développement des lésions glomérulaires chez l'humain (Hasslacher et coll., 1985), ainsi que chez le rat (Cooper et coll., 1987).

PATHOGENÈSE

Deux écoles de pensées ont longtemps débattu la question concernant l'origine pathologique responsable du développement des lésions glomérulaires au cours du

diabète. Bien que le sujet soit encore controversé aujourd'hui, la plus part des données semblent indiquer que le développement de la microangiopathie diabétique est directement relié à l'hyperglycémie. Telle était la théorie présentée par Williamson en 1977 (Williamson, 1977). Cependant à cette époque, l'idée contraire présentée par Siperstein, suggérait que la microangiopathie diabétique et plus particulièrement l'épaississement des membranes basales de capillaires, observé chez les diabétiques, n'étaient pas la conséquence d'une insuffisance en insuline, mais plutôt un phénomène extra-métabolique relié à l'expression des gènes de prédisposition au diabète (Siperstein et coll., 1968). En résumé, d'après Siperstein, l'épaississement des membranes basales de capillaires au cours du diabète, ne serait pas dû à l'état diabétique en soi, mais plutôt à certains facteurs génétiques. La théorie de Siperstein est basée sur des analyses quantitatives en microscopie électronique qui visaient à déterminer l'épaisseur de membranes basales de capillaires présents au niveau du quadriceps fémoral chez des individus normaux, chez des patients diabétiques ainsi que chez des individus considérés "pré-diabétiques" (individus normaux qui ont deux parents diabétiques). Dans cette étude, Siperstein constate que l'incidence de la microangiopathie (épaississement des membranes basales) est plus élevée chez des patients pré-diabétiques que chez des individus normaux. Williamson, contestait les conclusions de Siperstein, n'ayant pu observer lui-même l'épaississement des membranes basales chez des diabétiques juvéniles. D'autre part, Williamson constatait que l'épaississement des membranes basales était un phénomène progressif et relié à la durée du diabète. Le débat était alors ouvert. Plusieurs auteurs critiquaient les méthodes de préparation des tissus utilisées par Siperstein, alors que d'autres insinuaient que

les méthodes d'analyses morphométriques utilisées par Siperstein étaient beaucoup plus sensibles et reproductibles que celles utilisées par Williamson. De son côté, Williamson critiquait fortement la valeur de l'échantillonnage de Siperstein, du fait que l'âge moyen du groupe d'individus diabétiques et pré-diabétiques était supérieur d'au moins dix ans à l'âge moyen des individus du groupe contrôle. Depuis, de nombreux chercheurs ont démontré le lien entre l'hyperglycémie et l'épaississement de membranes basales, écartant ainsi les conclusions de Siperstein.

En effet, les lésions glomérulaires sont observées dans plusieurs types de diabète, incluant le diabète expérimental chez des animaux rendus hyperglycémiques chimiquement (Mauer et coll., 1981; Steffes et coll., 1982; Bendayan, 1985). Ces observations démontrent que les prédispositions génétiques du diabète de type I ou de type II, ne sont pas nécessaires au développement des lésions vasculaires. De plus, on sait depuis longtemps que la greffe d'un rein normal chez des patients diabétiques, provoque au niveau du rein implanté, l'apparition des lésions vasculaires (Mauer et coll., 1976) et l'épaississement des membranes basales glomérulaires (Mauer et coll., 1983). Récemment, un groupe de Minneapolis (Fioretto et coll., 1997) a examiné l'effet de la greffe isolée de pancréas sur l'évolution de la néphropathie diabétique chez des receveurs diabétiques. Après dix ans suivant la transplantation, ils observent une diminution significative de l'épaisseur de la MBG ainsi que de l'expansion mésangiale. Ces résultats démontraient pour la première fois que les lésions typiques de la néphropathie diabétique régressent suite à une normalisation de la glycémie. Dernièrement, des

chercheurs ont démontré que la normalisation de la glycémie par l'injection d'insuline (Kern et Engerman, 1990) ou par la transplantation d'îlots pancréatiques (Pugliese et coll., 1997), diminue de façon considérable les altérations fonctionnelles et structurales du glomérule chez le rat et chez le chien. D'un autre côté, des études génétiques et épidémiologiques effectuées dans les années 90 suggèrent que certains facteurs génétiques augmentent le risque de développer une néphropathie. Entre autre, certaines mutations au niveau des gènes du collagène de type IV (Krolewski, 1999) et le polymorphisme du gène pour le récepteur à insuline (Doria et coll., 1992) sont associés au développement de la protéinurie. Toutefois, les évidences disponibles pour le moment, supportent l'hypothèse suggérant le rôle majeur de l'hyperglycémie dans le développement de la néphropathie diabétique.

HYPERGLYCÉMIE ET GLOMÉRULOPATHIE DIABÉTIQUE

Des études sur tissus en culture *in vitro* ont démontré l'influence du glucose sur la croissance des cellules rénales ainsi que sur le métabolisme de la matrice extracellulaire. En outre, l'incubation prolongée des cellules glomérulaires (cellules mésangiales, épithéliales et endothéliales) dans un milieu hyperglycémique, induit une augmentation de la synthèse protéique et une hausse de l'expression des ARNm qui codent pour le collagène de type IV, la laminine et la fibronectine (Ayo et coll., 1990; Danne et coll., 1993; Ziyadeh et Cohen, 1993) mais une diminution de

l'expression des héparanes sulfates et du perlecan (Olgenmöller et coll., 1992; van Det et coll., 1996). Ces observations sont appuyées par les résultats obtenus à l'aide de la technique d'hybridation *in situ* (Suzuki et coll., 1997). Récemment, des études *in vitro* (Wolf et coll., 1992; Ziyadeh et coll., 1994) et *in vivo* (Park et coll., 1997), ont démontré que la stimulation du facteur de transcription TGF- β par le glucose, induisait la synthèse des composants extracellulaires. Le glucose semble donc agir via différents mécanismes:

La voie du polyol

L'hyperglycémie induit une augmentation intracellulaire du glucose. En effet, dans certaines cellules (cellules nerveuses, cellules rénale et cellules vasculaires), le transport intracellulaire du glucose n'est pas dépendant de l'insuline. Ainsi, au cours de conditions hyperglycémiques, le surplus de glucose devient rapidement toxique pour ces cellules. Le glucose intracellulaire est impliqué dans l'activation de la voie du sorbitol. L'excès de glucose intracellulaire est métabolisé en sorbitol, par une enzyme, l'aldose réductase (Greene, 1988) et éventuellement en fructose. L'accumulation intracellulaire du fructose et du sorbitol augmente l'osmolarité intracellulaire. Cela provoque l'absorption massive d'eau par les cellules ce qui crée des lésions cellulaires importantes (Kinoshita, 1974). L'accumulation du sorbitol est aussi associée à la diminution de la quantité de myo-inositol, ce qui provoque l'inhibition métabolique du phosphatidylinositol, une réduction de la

quantité du diacylglycérol, une réduction de l'activité de la protéine kinase C ainsi qu'une diminution de l'activité de l'ATPase sodium-potassium (Greene, 1988). Il est clair que l'augmentation de la voie du polyol entraîne de sérieuses lésions au niveau des cellules nerveuses. Cependant, il semble qu'au niveau du rein, la contribution de ce mécanisme soit assez minime, étant donné que l'injection de l'inhibiteur de l'aldose réductase ne réduit en aucun temps l'excrétion de l'albumine dans l'urine. En fait, les conséquences de l'augmentation de la voie du sorbitol au niveau du glomérule (diminution de la quantité de diacylglycérol) sont voilées par l'augmentation de la quantité de diacylglycérol formé par la voie de synthèse *de novo* (Craven et coll., 1989; Larkins et Dunlop, 1991). L'augmentation du glycérol entraîne l'augmentation de la quantité de PKC. Celle-ci semble associée à l'augmentation de synthèse des composants matriciels au cours du diabète, via probablement l'activation de TGF- β . D'autre part, il a été démontré que l'injection de l'inhibiteur de l'aldose réductase, entraîne une diminution de la fluorescence du collagène au cours du diabète. Il semble y avoir une corrélation positive entre la quantité de l'aldose réductase et les taux de fructolysation non-enzymatique (Gabbay et coll., 1972).

Glycosylation non-enzymatique

Aussi appelée réaction de "Maillard", la glycosylation (glycation) non-enzymatique se distingue des réactions impliquant des enzymes catalytiques comme certaines

glycosyltransférases au niveau des compartiments intracellulaires (Maillard, 1912; Monnier et Cerami, 1981; Monnier, 1993). Une partie importante des connaissances actuelles que l'on a sur la réaction de Maillard, est basée sur des recherches en chimie alimentaire couvrant la période de 1912 à 1975. La réaction de Maillard est initiée par la liaison chimique entre l'aldéhyde d'un sucre réducteur comme le glucose avec un groupement aminé d'une protéine ou avec un autre composé analogue. Cette réaction forme une base de Schiff qui est instable et réversible. Par la suite cette base de Schiff subit plusieurs réarrangements chimiques et forme un produit de glycation intermédiaire plus stable mais toujours réversible (Bunn et coll., 1978; Higgins et Bunn, 1978; Koenig et coll., 1982; Cohen, 1986). Ce produit de glycation intermédiaire est le produit d'Amadori et sa formation *in vivo* en présence de glucose s'effectue en quelques jours (Guthrow et coll., 1979; Shima et coll., 1991) (voir figure 4). Ce produit d'Amadori est identique à celui que l'on retrouve au niveau de l'hémoglobine glyquée et au niveau de l'albumine glyquée. Ces protéines glyquées sont présentes dans l'organisme normal, mais en faibles quantités. Des études récentes ont démontré qu'il y avait une corrélation entre la glycémie et les quantités de protéines glyquées circulantes (Day et coll., 1980; Day et coll., 1979; Cohen et Hud, 1989; Neuman et coll., 1994). Certains facteurs influencent l'intensité de la réaction. On sait entre autre que certains sucres sont chimiquement plus réactifs que d'autres. Par exemple, le ribose est 130 fois plus réactif que le glucose (Bunn et Higgins, 1981). La structure de la protéine influence aussi la réactivité des acides aminés. Par exemple, certaines protéines comme la ribonucléase, possèdent au niveau de son site catalytique un résidu lysine extrêmement réactif au glucose (Baynes et Monnier,

1989). Finalement, la vitesse de renouvellement de la protéine (demi-vie) est le principal facteur limitant le taux de glycation (Schleicher et Wieland, 1986). En effet, des études récentes démontrent que le taux de glycation des protéines plasmatiques et tissulaires dépend d'un équilibre entre la vitesse de synthèse et la vitesse de dégradation du produit d'Amadori. De ce fait, les protéines tissulaires comme le collagène, qui ont une demi-vie plus longue que les protéines circulantes, sont enclines à la glycation avancée (AGE) (Brownlee et coll., 1988; Vlassara, 1996). Les lipides et les acides nucléiques peuvent aussi subir des glycations avancées. Une fois l'Amadori formé, il subit une série de modifications qui mène à la formation de sucres déshydratés (déoxyosones) très réactifs, qui vont propager la réaction de Maillard et former des liens covalents croisés inter- et intramoléculaires dans la protéine. Ces molécules deviennent jaunes et insolubles. Si la réaction est très avancée, il se forme des mélanoïdines similaires aux dépôts retrouvés au fond d'un plat brûlé. Ces produits de glycation avancée sont irréversibles et s'accumulent au cours de la vie (Brownlee et coll., 1988; Vlassara, 1996; Makita et coll., 1991). Jusqu'à maintenant, on connaît deux produits de Maillard avancés, la pyrroline (Miyata et Monnier, 1992) et la pentosidine (Sell et Monnier, 1989). Cette dernière est hautement fluorescente et a été isolée à partir du collagène humain. Nous allons maintenant décrire le rôle de la glycation non-enzymatique dans le développement des lésions glomérulaires au cours du diabète.

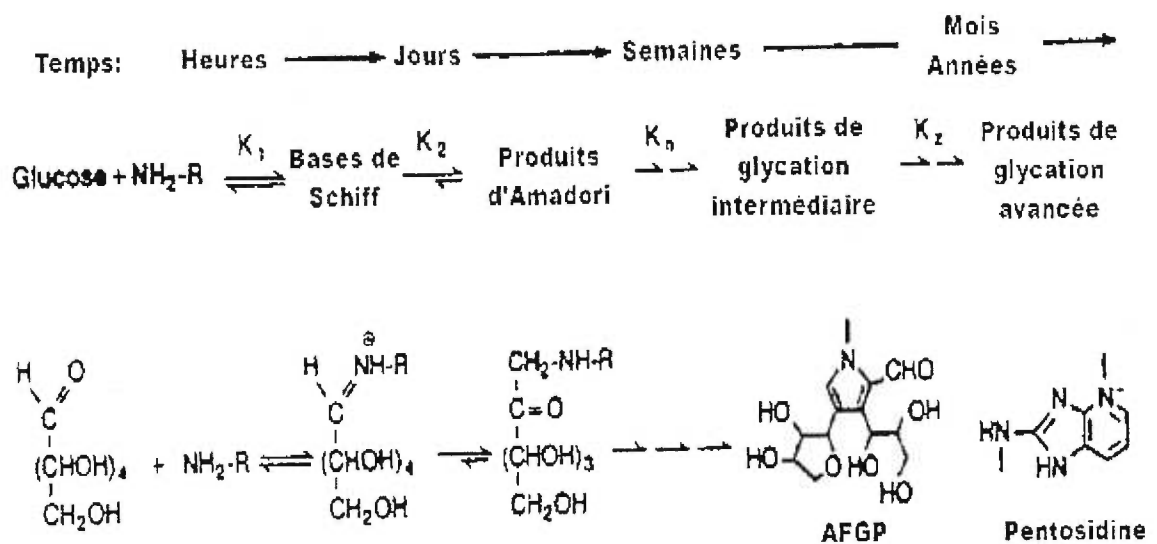


Figure 4 : Schéma démontrant les étapes de la glycosylation non-enzymatique.

Le glucose se lie à un acide aminé d'une protéine pour former une base de Schiff et éventuellement un produit d'Amadori. Par la suite les produits d'Amadori subissent des modifications biochimiques et forment des produits de glycation avancée (AGEs).

Modifiée de Ruderman et coll., 1992.

Glycosylation-non-enzymatique intermédiaire (produits d'Amadori)

L'étude du rôle des produits d'Amadori dans l'évolution de la néphropathie diabétique est moins extensive comparativement aux études qui concernent le rôle des AGEs au cours du diabète. Cependant, de plus en plus d'évidences démontrent le rôle central de ces produits de glycation intermédiaire dans l'initiation des lésions rénales au cours du diabète. Lorsque l'on injecte du plasma enrichi de produits d'Amadori à des animaux normaux, ces derniers développent des lésions glomérulaires "pseudo-diabétiques" caractérisées par un épaissement des membranes basales glomérulaires (McVerry et coll., 1980) et par une hyperfiltration glomérulaire (Sabbatini et coll., 1992). Il est bien établi que le produit d'Amadori augmente l'expression et la production de collagène de type IV au niveau de cellules mésangiales en culture et cela indépendamment de la concentration de glucose dans le milieu (Ziyadeh et Cohen, 1993). Plus récemment, Cohen et son équipe ont aussi démontré que l'albumine glyquée stimulait la production de collagène de type IV ainsi que de la fibronectine dans les cellules endothéliales glomérulaires en culture et ce, dans des conditions normoglycémiques (Cohen et coll., 1997; Ziyadeh et coll., 1998). Dernièrement, des chercheurs ont montré la présence des récepteurs spécifiques à l'albumine glyquée de type Amadori au niveau des cellules mésangiales (Wu et Cohen, 1995). De plus, en utilisant un anticorps spécifique contre albumine glyquée de type Amadori, Cohen prévient la surproduction de collagène de type IV dans les cellules mésangiales poussant dans un milieu contenant du plasma riche en produits d'Amadori (Ziyadeh et cohen, 1993). Étonnement, en injectant pendant huit semaines consécutives ce même

anticorps dans la circulation d'une souris hyperglycémique depuis quatre mois, Cohen et ses collaborateurs observent une réduction significative de l'excrétion de protéines dans l'urine ainsi qu'un taux d'expression normal de fibronectine et de collagène de type IV dans les cellules mésangiales, sans toutefois observer une réduction de la glycémie (Cohen et coll., 1994; Cohen et coll., 1995). Ces résultats indiquent que le changement de l'expression cellulaire observé chez les patients et chez les animaux diabétiques, est principalement causé par la présence d'albumine glyquée.

D'autres part, le produit d'Amadori peut aussi être oxydé par un ion métallique et former des résidus carboxyméthyl-lysine qui peuvent causer des lésions tissulaires importantes. De plus, des chercheurs ont démontré que l'albumine glyquée pouvait modifier la perméabilité vasculaire (Williams et coll., 1981; Londoño et coll., 1995). Comme ces observations nous le suggèrent, les modifications au cours du diabète semblent se produire rapidement. Ces modifications précoces semblent être reliées à la présence de protéines glyquées dans le sang. Il est donc crucial d'investiguer plus en détail le rôle des produits d'Amadori dans le développement des lésions glomérulaires qui se produisent dans des stades précoces du diabète.

Glycosylation non-enzymatique Avancée (AGE)

La membrane basale glomérulaire est un site vulnérable à la glycation non-enzymatique avancée (AGE). Ceci a été montré *in vitro* et *in vivo* (Trueb et coll., 1984; Garlick et coll., 1988). Ces produits (AGEs), activent des récepteurs

spécifiques à la surface de macrophages et stimulent la sécrétion de cytokines (Vlassara et coll., 1988). Cette substance stimule la synthèse de composants de la matrice extracellulaire. Récemment, il a été démontré que les produits de glycation avancée agissaient sur les cellules mésangiales via un facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et stimulaient la synthèse de collagène IV, laminine et de protéoglycanes (Doi et coll., 1992). De plus, la glycation non-enzymatique rend la MBG résistante à la digestion enzymatique par les collagénases. Il est maintenant clair que ces produits favorisent l'accumulation des constituants matriciels et l'épaississement de la MBG au cours du diabète. L'accumulation des AGEs au niveau de la membrane basale glomérulaire provoque la désorganisation structurale de celle-ci. En fait, la glycation du collagène de type IV diminue l'affinité de son domaine NC1 pour le domaine hélicoïdale d'une autre molécule de collagène, ce qui entraîne une diminution des associations latérales lors de la formation du réseau collagénique (Tsilbary et coll., 1988). De plus, la formation des AGEs sur la laminine entraîne une diminution du processus d'auto-assemblage de la protéine ainsi qu'une diminution de la liaison de la protéine avec le collagène de type IV et avec les héparanes sulfates. Ces modifications structurales modifient par le fait même les propriétés sélectives de la membrane basale glomérulaire (Boyd-White et Williams jr., 1996). On sait aussi que les groupes réactifs formés suite à l'accumulation de AGEs dans la MBG, peuvent former des liens covalents avec certaines protéines solubles comme l'albumine (Michael et Brown, 1981), l'immunoglobuline et des lipoprotéines. Ce phénomène de liaison peut entraîner l'installation de complexes immuns au niveau de la membrane basale et provoquer ainsi des atteintes immunes (Couser et coll., 1984).

HYPOTHÈSE DE TRAVAIL ET OBJECTIF DE NOTRE ÉTUDE

Le rôle et les propriétés sélectives de la paroi glomérulaire ont fait l'objet d'études très détaillées (Farquhar et coll., 1961; Graham et Karnovsky, 1966; Caufield et Farquhar, 1974; Laliberté et coll., 1978, Bendayan et coll., 1986). Il est connu que la paroi glomérulaire, grâce aux propriétés sélectives de la MBG basées sur la taille et la charge, exclut le passage des macromolécules sériques comme l'albumine (Brenner et coll., 1978). Au cours du diabète, la perméabilité sélective de la paroi glomérulaire est altérée et cette altération entraîne l'apparition de la protéinurie (Hostetter, 1986; Viberti et coll., 1982; Viberti et coll., 1993). Dans des stades avancés de la maladie, la perte de la fonction glomérulaire est concomitante à des changements au niveau de la structure (Farquhar et coll., 1959; Hirose et coll., 1982; Bendayan, 1985; Østerby, 1986; Østerby et coll., 1998; Desjardins et Bendayan, 1990) et de la composition (Beisswenger et Spiro, 1970; Pathasarathy et Spiro, 1982; van den Born et coll., 1995) de la MBG, à l'hyperfiltration glomérulaire (Ditzel et Junker, 1973; Christiansen et coll., 1981b) ainsi qu'à la glycation non-enzymatique des protéines sériques (Bunn et coll., 1978; McFarland et coll., 1979; Guthrow et coll., 1979; Day et coll., 1980) et des constituants de la MBG (Cohen et coll., 1980; Trueb et coll., 1984; Garlick et coll., 1988; Tomino et coll., 1991). Toutefois, il est difficile d'associer un seul de ces facteurs à la perte de la perméabilité glomérulaire au cours du diabète. Plusieurs études récentes ont démontré la présence d'altérations au niveau de la paroi glomérulaire dans des stades très précoces du diabète. Morya et coll., ont observé au niveau des MBG chez le rat, une diminution des charges après seulement dix jours d'hyperglycémie.

Ce résultat suggère que les changements au niveau du rein se produisent très rapidement au début de la maladie (Moriya et coll., 1993b). D'autres chercheurs ont observé l'apparition d'une hyperfiltration glomérulaire très rapidement après l'induction du diabète chez des animaux (Sabbatini et coll., 1992; Garcia et coll., 1998). De plus, beaucoup d'études révèlent une augmentation très rapide de l'expression des ARNm qui codent pour les protéines structurales de la MBG après l'induction du diabète chez le rat (Park et coll., 1997; Wu et coll., 1997; Fukui et coll., 1992). Bien que la microalbuminurie soit détectée très tôt chez des patients diabétiques, aucune étude n'a démontré directement la perte de la perméabilité sélective au niveau de la paroi glomérulaire à un stade précoce de la maladie. Étant donné que plusieurs déterminants de la perméabilité glomérulaire sont modifiés très rapidement au début de la maladie, il se pourrait bien que la perméabilité sélective de la paroi soit aussi rapidement modifiée.

Chez l'humain, il est difficile d'étudier les mécanismes impliqués dans la perte de la perméabilité glomérulaire au début de la maladie, étant donné le stade déjà avancé des lésions morphologiques et fonctionnelles du glomérule, lors du diagnostic de la maladie. L'utilisation de modèles d'animaux diabétiques ne pose pas ce problème et offre plusieurs avantages. Bien que le modèle de rats diabétiques par l'injection de la streptozotocine soit généralement utilisé pour l'étude de la néphropathie diabétique, la phase correspondant au stade initial de l'altération de la perméabilité glomérulaire, n'a pas encore été déterminée chez ces animaux.

Au cours de cette étude, nous voulions d'abord vérifier si la perte de la perméabilité glomérulaire était présente dans des temps précoces du diabète. Dans un deuxième temps, nous voulions voir s'il y avait une corrélation entre l'altération de la perméabilité glomérulaire et les changements morphologiques précoces, dans le but d'approfondir notre compréhension sur les processus qui entraînent l'altération fonctionnelle de la paroi glomérulaire. Nous avons choisi comme paramètres morphologiques l'épaisseur des MBG ainsi que la distribution du collagène de type IV à l'intérieur de la MBG. Afin de déterminer la perméabilité de la MBG, nous avons investigué le passage de l'albumine endogène au travers la paroi glomérulaire chez des rats normaux et hyperglycémiques. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique d'immunocytochimie à l'or colloïdal combinée à la protéine A-or . De plus, à l'aide d'analyses morphométriques, nous avons mesuré l'épaisseur des MBG et nous avons obtenu la distribution de l'albumine au travers de la paroi glomérulaire pour chacun des animaux afin de pouvoir les comparer statistiquement. En utilisant la même approche, nous avons obtenu la distribution du collagène de type IV au niveau des MBG des différents animaux. Finalement, nous voulions vérifier si l'altération de la perméabilité glomérulaire pouvait être réversible par un contrôle stricte de la glycémie.

Modèle animal

Le diabète expérimental a été induit chez des rats mâles de type Sprague-Dawley par l'injection intra-péritonéale d'une seule dose de streptozotocine. La

streptozotocine est une drogue cytotoxique qui détruit de façon spécifique les cellules bêtas des îlots de Langerhans au niveau du pancréas. Cette destruction est irréversible et provoque une diminution importante de la sécrétion de d'insuline. De fait, 48 heures suivant l'injection de la drogue, les rats présentent une hyperglycémie importante qui se poursuit tout au long de l'expérience. Les rats injectés avec la streptozotocine sont donc un modèle du diabète de type I (diabète insulino-dépendant). En effet, ces rats diabétiques présentent des lésions similaires à celles observées chez des patients souffrant du diabète de type I. Ces similarités incluent l'hypertrophie rénale (Seyer-Hansen, 1977), l'augmentation du volume rénal (Rash et Dørup, 1997), une expansion mésangiale (Rash, 1979b), un épaississement des membranes basales glomérulaires (Rash, 1979a) ainsi que l'albuminurie (Mauer et coll., 1976; Rash, 1980). D'autres similarités plus générales au diabète mellitus sont aussi observées. En outre, les rats présentent une polyurie (excrétion de quantité excessive d'urine), une diarrhée, un amaigrissement, la polydipsie (soif excessive), ainsi que le développement de cataractes.

Les animaux que nous avons injectés par la streptozotocine ont été gardés hyperglycémiques pendant dix jours, deux, quatre, et six mois respectivement. Les animaux contrôles ont été injectés avec une solution de citrate de sodium et sont demeurés normoglycémiques tout au long de l'expérience. La glycémie et la glucosurie ont été contrôlées régulièrement au cours de l'expérience. Un groupe d'animaux est resté hyperglycémique pendant deux mois puis a été traité quotidiennement à l'insuline pendant un mois. La dose d'insuline a été ajustée individuellement pour chaque animal en fonction de leur glycémie.

Immunocytochimie

Les sites antigéniques pour l'albumine endogène et pour le collagène de type IV ont été révélés en utilisant des anticorps spécifiques polyclonaux en combinaison avec la technique d'immunocytochimie en post-enrobage avec la protéine A-or. L'anticorps contre le collagène de type-IV reconnaît la sous-unité globulaire qui se trouve du côté c-terminal de la protéine. La spécificité de nos anticorps a été vérifiée par des études contrôles. Cette méthode a déjà été utilisée pour l'étude de la perméabilité vasculaire (Bendayan et coll., 1986; Ghitescu et Bendayan, 1992; Bendayan et Rasio, 1996). De plus, la nature particulière de l'or colloïdal nous permet d'effectuer des analyses morphométriques. Contrairement à notre technique, les méthodes utilisant des traceurs exogènes denses aux électrons peuvent introduire des modifications au niveau de la perméabilité vasculaire (Cotran et Karnovsky, 1967; Simionescu, 1979; Villasschi et coll., 1986). De plus, contrairement aux études de clairance qui évaluent de façon globale la filtration glomérulaire et la réabsorption tubulaire, notre technique nous permet d'évaluer uniquement les processus associés à la paroi glomérulaire

Le principe de la protéine A-or

La protéine A a été identifiée, caractérisée et purifiée à partir de la bactérie *Staphylococcus aureus* (Verwey, 1940, Forsgen et Sjöquist, 1966). La protéine A est composée d'une seule chaîne polypeptidique dont le poids moléculaire est de 42 kDa. Cette protéine possède la propriété de se lier au fragment Fc des

immunoglobulines G (IgG) et avec certains IgA et IgM (Goundswaard et coll., 1978; Lindmark et coll., 1983). L'interaction entre la protéine A et l'immunoglobuline est une réaction pseudo-immune qui se produit sur les domaines CH₂ et CH₃ du fragment Fc (Deisenhofer, 1981). Cette association n'interfère pas dans la liaison entre l'immunoglobuline et son antigène. De plus, la protéine A est très stable aux changements de température et de pH ainsi qu'en présence d'agents dénaturants. La figure 5 illustre bien le principe de la protéine A-or.

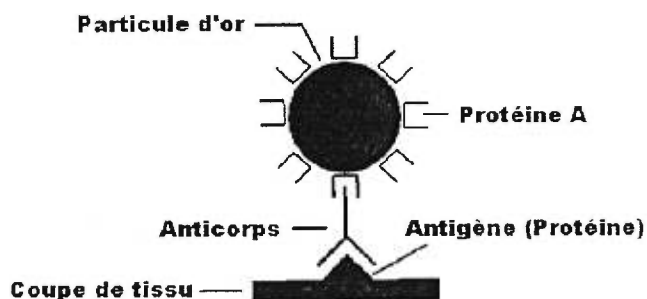


Figure 5: Schéma démontrant le principe de la protéine A-or.

L'immunoglobuline reconnaît de façon spécifique un antigène donné. Une protéine A liée à une particule d'or colloïdale est reconnue par le fragment Fc de l'immunoglobuline. Il se forme donc un complexe qui comprend un antigène, un anticorps et une protéine A-or.

ARTICLE

**GLOMERULAR BASEMENT MEMBRANE SELECTIVE
PERMEABILITY IN SHORT-TERM STREPTOZOTOCIN-
INDUCED DIABETIC RATS**

Michèle Doucet, Irène Londoño, Amparo Gómez-Pascual
and Moïse Bendayan

Sous presse dans:

International Journal of Experimental Diabetes Research

ARTICLE

**GLOMERULAR BASEMENT MEMBRANE SELECTIVE
PERMEABILITY IN SHORT-TERM STREPTOZOTOCIN-
INDUCED DIABETIC RATS**

Michèle Doucet, Irène Londoño, Amparo Gómez-Pascual
and Moïse Bendayan

Département de pathologie et biologie cellulaire,
Faculté de Médecine,
Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

ABSTRACT

In diabetes, the glomerular basement membrane undergoes thickening and structural alterations with loss of glomerular permselectivity properties. However, the onset of the alterations at early phases of diabetes is unclear. Aiming to determine the functional and structural alterations of the glomerular wall in the early stages of diabetes, we have studied the distribution of endogenous circulating albumin and type IV collagen in the glomerular basement membrane, using the immunocytochemical approach. The streptozotocin-injected hyperglycemic rat was our animal model. Renal tissues were examined after 10 days, 2, 4 and 6 months of hyperglycemia. Upon immunogold labelings, changes in the glomerular permeability to endogenous albumin were found altered as early as upon ten days of hyperglycemia. In contrast, no structural modifications were detected at this time point. Indeed, glomerular basement membrane thickening and an altered type IV collagen labeling distribution were only observed after four months of hyperglycemia suggesting that functional alterations take place early in diabetes prior any structural modification. In order to evaluate the reversibility of the glomerular alterations, two-month old diabetic animals were treated with insulin. These animals showed a significant restoring of their glomerular permselectivity. Our results suggest a link between glycemic levels and alteration of glomerular permeability in early stages of diabetes,

probably through high levels of glycated serum proteins.

Key words: Glomerular Basement Membrane; Albumin; Type IV Collagen; Insulin; Immunocytochemistry.

INTRODUCTION

The glomerular wall plays an important role in blood filtration. Its properties have been extensively studied by ultrastructural approaches using various circulating endogenous and exogenous markers [1-5]. Such studies have demonstrated that the transglomerular passage of serum proteins and macromolecules is highly selective. Serum albumin for example, which has a molecular weight of 68 kDa, is normally excluded from transglomerular transport and is not found in significant amounts in the urine [5-8]. The exclusion of this protein has been considered to be the combined result of size restriction and electrostatic charge repulsion [9]. However, it has been well documented that in diabetic nephropathy, the glomerular permselectivity is markedly impaired, leading to proteinuria [10-11]. The loss of glomerular selective permeability occurring in long-term diabetic condition appears to be concomitant with several other alterations such as increase in glomerular filtration rate [12-13], glycation of proteins [14-18] and basement membrane components [19-22], as well as modifications in the structure and composition of the basement membrane [23-30]. Therefore, associating a single ethiopathological factor to the pathogenesis of glomerular permeability is rather difficult.

Several studies have investigated renal alterations occurring early in diabetes. Renal extracellular matrix gene expression in early stages of

experimental diabetes was found to be altered with a marked increase in the mRNAs expression of α chains of type IV procollagen [31-34] and β chains of laminin [32-33]. In addition, increases in expression of the inhibitor of metalloproteinase-1 [31] and TGF- β [33-34] mRNAs have also been reported. In contrast, expression of heparan sulfate proteoglycans [32] and metalloproteinase-2 [31] mRNAs seems to undergo decreases. Moriya et al. have demonstrated that changes in the charge selective barrier of the glomerular basement membrane (GBM) may occur in early stages of experimental diabetes, as early as one week after induction of diabetes [35]. Physiological studies have, on the other hand, shown the existence of microalbuminuria prior to the development of the clinically persistent proteinuria in human diabetes [36]. Microalbuminuria in early phases of diabetic nephropathy seems to be due to, or is concomitant with disturbances of the charge barrier of the GBM and is followed by damages to the size restriction barrier [37-38]. Although streptozotocin induced-diabetic rats are generally used for the study of the early phases of diabetic nephropathy, timing in the loss of selective permeability properties of the GBM in this experimental model has yet to be determined. The present study was focused on the glomerular wall, assessing its functional and structural features rather than the overall renal function through clearance evaluations which include the tubular reabsorption.

Application of the post-embedding immuno-gold method on renal tissues allows for the high-resolution localization of endogenous albumin within the glomerular wall. This approach was previously applied to the investigation of glomerular permeability in long-term diabetic animals and carries major advantages [5]. Indeed, the post-embedding approach allows for the detection of serum proteins retained in situ under physiological steady-state conditions. This contrasts with methods using exogenous electron-dense tracers introduced into the circulation with adverse effects on vascular permeability [39-41]. Furthermore, due to the particulate nature of the colloidal gold marker, morphometric evaluations can be performed assessing the passage of endogenous serum components through vascular walls [5,42-43]. In the present study, we have investigated the distribution of endogenous serum albumin across the glomerular wall, as a parameter reflecting the glomerular permselectivity properties. The work was carried out on animals at early stages of diabetes as well as on insulin-treated diabetic animals. We established correlations between the time points at which glomerular functional alterations and ultrastructural modifications appear as well as the reversibility of these alterations upon insulin treatment. Results have demonstrated that as early as upon ten days of hyperglycemia, albumin distribution through the glomerular basement membrane is altered, despite the absence of glomerular basement membrane thickening and normal type IV collagen distribution. In addition, glycemic control achieved by insulin

treatment, appears to restore the permselectivity properties of the glomerular wall in an early phase of diabetes.

Materials and methods

Animals. An experimental hyperglycemic state was induced in 100 g male Sprague-Dawley rats by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (70 mg/kg body weight) dissolved in 10 mmol/l citrate buffer, pH 4.5. The hyperglycemic state developed within the first 48 h after injection and continued throughout the entire life-time of the animals. This was assessed by regular measurements of glycosuria and glycemia carried out using Multistix and Dextrostix reagent strips (Miles Ames, Ontario, Canada). Levels of circulating insulin (postprandial) were determined by radioimmunoassay (insulin RIA kit, Chromacod, Bio Ria, Montreal, Quebec) on blood samples collected at the end of each experiment. Animals of the control group which received only the citrate buffer, remained normoglycemic. Nine groups, each comprising of at least three animals, were created. Groups 1 to 4 consisted of streptozotocin-injected animals of ten days, two, four and six months of hyperglycemia, respectively. Group 5 consisted of two-month hyperglycemic animals which afterwards were treated subcutaneously by daily injections of human biosynthetic insulin (Eli Lilly Co., Indianapolis, IN, USA) for one month. The amounts of insulin ranged from 15 to 20 units/day depending on the animal and were adjusted according to bi-weekly blood glucose monitoring. Groups 6, 7, 8 and 9 consisted of age-matched control animals to groups 1 to 4. At time of death, the body weight was measured and blood samples were taken. Streptozotocin-injected rats

displayed high blood glucose and low insulin levels compared to the age-matched control animals (Table 1). Blood glucose levels averaged 29.4 ± 1.0 mmol/l for the hyperglycemic animals (groups 1 to 4) vs 6.6 ± 0.35 mmol/l for their age-matched controls (groups 6 to 9) and 4.9 ± 0.8 mmol/l for the insulin-treated streptozotocin-injected animals (group 5). The hyperglycemic animals also displayed important polyuria with total urine 24 h volumes of 113 ± 13 ml (vs 6.7 ± 1.5 ml for the controls). Protein and albumin excretion were of 70.8 ± 8.6 mg/24 h and 21.5 ± 6.0 mg/24 h respectively (vs 38.9 ± 7.0 mg/24 h and 1.5 ± 0.5 mg/24 h for the controls).

Tissue processing. The animals were anesthetized with urethane and the kidney cortex was immediately fixed in situ by immersion with a periodate-lysine-paraformaldehyde solution [44]. Small tissue fragments were sampled and maintained in the fixative for two hours at 4°C. They were then rinsed in 0.1 mol/l phosphate buffer, dehydrated in methanol and embedded in Lowicryl K4M at -20°C as previously described [45]. Ultrathin sections were cut, mounted on Parlodion-carbon coated nickel grids and processed for immunocytochemistry.

Immunocytochemistry. Antigenic sites for endogenous albumin and type IV collagen were revealed using specific polyclonal antibodies (Cappel, West Chester, PA, USA and Chemicon, Temecula, CA, USA, respectively) in

combination with the protein A-gold post-embedding immunocytochemical technique. The labeling procedure was carried out as previously described [45]. Briefly, the grids carrying the tissue thin-sections were incubated on a drop of 0.15 mol/l glycine in 0.01 mol/l phosphate buffered saline pH 7.3 (PBS) for 20 min, and transferred on a drop of PBS containing 1 % gelatin (Nanoprobes Inc, NY, USA) for an additional 10 min. Next, the grids were incubated overnight at 4°C on a drop of the anti-albumin polyclonal antibody (1:50) or 3 hours at room temperature on a drop of the anti-type IV collagen polyclonal antibody (1:40). After rinsing in PBS, the sections were incubated with 0.15 mol/l glycine in PBS for 20 min and transferred on a drop of the protein A-gold complex (10 or 15 nm) for a 30 min incubation at room temperature [45]. The grids were then washed with PBS, rinsed in distilled water and dry. The tissue sections were stained with uranyl acetate and examined with a Philips 410 electron microscope. The specificity of each immunolabeling was assessed by various control experiments: incubation with the protein A-gold solution alone, omitting the antibody step, and incubation with the antibody solution to which the corresponding antigen was added in excess, followed by the protein A-gold complex.

Morphometric analysis. For both antigens, the exact location of the gold particles over the glomerular basement membrane was analyzed by a morphometrical approach using an image processing system (Videoplan 2,

Carl Zeiss Inc., Toronto, Canada). The pictures were recorded at X 16 900 and printed to a final magnification of X 42 250. At least fifteen pictures were analyzed for each antigen and for each animal. The distance between each individual gold particle and the abluminal plasma membrane at the base of the endothelial cells was recorded. Simultaneously, at the same site, the distance between the base of endothelial cell and the podocyte was also measured. The ratio

$R = \frac{\text{distance (Endothelium - gold particle)}}{\text{distance (Endothelium-Epithelium)}}$ between these two values was calculated. On average, 500 ratio values were recorded for each animal and each antigen. The distribution of these ratio values ($0 < R < 1$) was determined and represented as histograms. Mean values were calculated and statistically evaluated using the Mann-Whitney U test.

RESULTS

Electron microscopy examination of renal tissue revealed the glomerular basement membrane between the endothelial and the epithelial cells of the glomerular wall, with its three characteristic regions: the lamina lucida interna on the subendothelial side, the lamina densa in the central part and the lamina lucida externa on the epithelial side (fig 1). Morphometrical analysis showed that basement membrane thickness of control and hyperglycemic animals at ten days and two months are similar. In contrast, the four and six-month hyperglycemic animals display significant thickenings with respect to the normoglycemic age-matched animals (Table 1). In addition, at six months in hyperglycemic condition, the mesangial regions display large accumulations of basement membrane material, confirming previous reports [5,23,24,26].

In normoglycemic animals, gold particles revealing endogenous rat albumin antigenic sites, were found over the flocculent material present in the capillary lumina (circulating protein), as well as over the glomerular basement membrane. Labeling was almost absent in the urinary space. The labeling over the glomerular basement membrane appeared intense over the subendothelial side with few particles over the lamina densa. The lamina lucida externa on the epithelial side, was almost free of labeling (fig. 1A). In

tissues from hyperglycemic animals, the distribution of the labeling was similar to that of the normoglycemic animals although the gold particles were more numerous over the lamina densa and lamina lucida externa (fig. 1B). Intense labeling was also detected over the enlarged mesangial regions. Treatment of hyperglycemic animals with insulin appeared to reverse somehow the distribution of this labeling, the gold particles being more numerous over the lamina lucida interna (fig. 1C)

Morphometrical evaluation of the distribution of the labelings through the GBM confirmed these subjective observations. The ratio values "R" between the distance of the gold particles to the abluminal endothelial plasma membrane and the thickness of the basement membrane at the same site, generated on tissues from normal and hyperglycemic animals, are reported in figure 2. In the normoglycemic animals, a peak was systematically found at the level of the subendothelial side of the GBM ($0.30 < R < 0.34$) (figs. 2A,2C,2E,2G). In contrast, hyperglycemic animals displayed much more extended distributions with the major peak shifting to the right towards the subepithelial side of the GBM ($R > 0.4$) (figs. 2B,2D,2F,2H). The shifts occur as early as upon ten days of hyperglycemia and become more important along with the duration of the hyperglycemic state. The Mann-Whitney U test demonstrated the significance of the differences between labeling distributions from normoglycemic and hyperglycemic animals at time points

as early as after ten days of hyperglycemia and thereafter ($p < 0.01$) On the other hand, the labeling distribution of albumin for the insulin-treated streptozotocin-injected animals (fig. 3B) was similar to that of the age-matched normoglycemic animals (fig. 2C) and differed significantly from that of the age-matched hyperglycemic animals ($p < 0.01$) (fig. 3A).

The ultrastructural localization of type IV-collagen was also studied on tissues of two and four-month hyperglycemic and age-matched control animals. Labeling by gold particles was restricted to the extracellular matrix and was absent from the capillary lumina, urinary space and glomerular cells (fig. 4). The labeling of the glomerular basement membrane was mainly located over the lamina densa in tissues of two-month normoglycemic and hyperglycemic animals (fig. 4). At four months of hyperglycemia, the labeling was distributed mainly on the subendothelial side of the GBM which indicates an important alteration in the type IV collagen distribution. The morphometrical evaluation reported in figure 4 confirmed these results.

The experiments performed to assess the specificity of the immunocytochemical results yield either no labeling or few gold particles over the different glomerular structures (results not illustrated).

DISCUSSION

In the present study, the protein A-gold immunocytochemical technique was applied on renal tissues of normal and hyperglycemic animals as well as of insulin-treated animals for assessing the passage of endogenous albumin through the glomerular wall. In contrast to the clearance studies which evaluate the overall GBM filtration and tubular reabsorption [46], the morpho-immunocytochemical study allows for the evaluation of processes occurring solely at the level of the glomerular wall [5, 8]. Streptozotocin-injected hyperglycemic animals displayed the typical alterations related to diabetes with high blood glucose and low insulin levels with strong proteinuria and major deficiency in weight gain. In addition, animals with four months of hyperglycemia and over, displayed the renal alterations characteristic of the diabetic glomerulopathy with thickening of glomerular basement membrane and enlargement of mesangial matrix [10,23,26].

In the normoglycemic animals of all ages, albumin antigenic sites were detected in capillary lumina and in the GBM mainly on its subendothelial side, few being located to the epithelial side. This suggests that in normal condition, albumin is mainly retained by the GBM preventing its passage from blood to the urinary space. This result is in agreement with previously reported ones [5, 8]. In contrast, in hyperglycemic animals, including those at ten days, albumin antigenic sites were no longer preferentially accumulated on the subendothelial side of the GBM, the distribution of the labeling having shifted towards the epithelial side of the GBM. This indicates that the retention of albumin by the GBM, is altered in short-term hyperglycemic condition, as it is for long-term diabetic animals [5]. As a matter of fact, many studies have established that

important alterations in the biochemical and biophysical properties of the GBM occur in long-term diabetes and follow, or are concomitant with, the loss of the glomerular permselectivity. These alterations correspond mostly to the thickening of the GBM which constitutes the hallmark of diabetic glomerulopathy [26,47] and is the result of enhanced synthesis and decreased turnover of its structural components [48]. Although, recent observations reported increased expression of TGF- β and type IV procollagen [31-34] and a decreased expression of metalloproteinases [31,49] in the GBM at the early phase of diabetes, the accumulation of GBM components as early as upon three months of diabetes is controversial [34]. In our study, GBM thickening was observed only after four months of hyperglycemia. Along with this thickening, changes in the distribution of type IV collagen were also observed after four months of hyperglycemia as in long term diabetes [25-27,50]. These structural alterations thus appear long after changes in glomerular permselectivity to albumin which occur as early as upon ten days of hyperglycemia, indicating that the onset of morphological changes does not correlate with the early loss of GBM selective filtration properties. The possibility that such early alterations could in principle be attributed to a direct nephrotoxic action of streptozotocin can be ruled out since the alterations of the glomerular wall observed in the hyperglycemic animals are fully restored by the insulin treatment.

Loss of glomerular filtration properties in early diabetes could be explained by other factors or combination of factors. Heparan sulfate proteoglycans (HSPG) through their anionic charges, play important roles in the filtration properties of the GBM [29-30]. Decrease synthesis of glomerular HSPG was previously found in early [35,51] as well as

late [52] stages of experimental diabetes. Therefore, charge barrier alterations could explain the early loss of permselectivity properties of the GBM [35]. On the other hand, physiological factors such as the glomerular plasma flow and filtration rates also affect glomerular function [53-54], their real contribution to the loss of glomerular permselectivity in early stages of diabetes remains however uncertain [55].

Recent studies indicate that alterations in vascular permeability during diabetes, could be due to glycation of serum proteins [56-63]. Amadori products are the predominant forms of circulating glycated proteins in diabetic subjects [64]. Their formation is rapid [18,63,65] and their half-life short [66]. Therefore, levels of Amadori products in serum are directly related to the ambient glucose and are significantly enhanced in diabetic conditions [67, 68]. In vitro [56, 69, 70] and in vivo [58, 60, 69, 71] studies have demonstrated that Amadori products increase vascular permeability. Along the same line, in vitro studies on isolated glomerular basement membranes, suggest that the sieving coefficient for glycated albumin is greater than that for the native one [59]. Recent studies have also shown that glycated albumin injected into the circulation of normal animals cross easily the glomerular wall and increases the filtration of non-glycated albumin [61-62]. Alteration of albumin conformation as well as particular interactions with GBM components have been proposed to explain this enhanced glomerular passage of native albumin [61, 69, 71].

Our present results also show that the altered glomerular albumin distribution in two-month hyperglycemic animals is restored when blood glucose levels are normalized by

insulin treatment. This supports the assumption that insulin treatment can restore permselective properties of the GBM. Since Amadori adducts formation is directly related to blood glucose levels [67], we can assume that insulin treatment, by reducing blood glucose levels, decreases concentrations of circulating Amadori products thus restoring glomerular function. In conclusion, we propose that circulating glycated albumin already present as early as upon ten days of hyperglycemia, could enhance glomerular permeability at very early stages and could potentially lead to glomerular injuries.

ACKNOWLEDGMENTS:

The authors acknowledge Gaetan Mayer and Diane Gingras for technical assistance and Jean Leveillé for photographic work.

This study was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada.

References

1. Farquhar, M.G., Wissing, S.L., Palade, G.E. (1961) Glomerular permeability I. Ferritin transfer across the normal glomerular capillary wall, *J. Exp. Med.*, **113**, 47-66.
2. Graham, R.C., Karnovsky, M.J. (1966) Glomerular permeability: Ultrastructural cytochemical studies using peroxidase as protein tracers, *J. Exp. Med.*, **124**, 1123-1134.
3. Caufield, J.P., Farquhar, M.G. (1974) The permeability of glomerular capillaries to graded dextrans. Identification of the basement membrane of capillaries as the primary filtration barrier, *J. Cell Biol.*, **63**, 883-903.
4. Laliberté, F., Sapin, C., Belair, M.F., Druet, P., Bariety, J. (1978) The localization of the filtration barrier in normal rat glomeruli by ultrastructural immunoperoxidase techniques, *Biol. Cell*, **31**, 15-26.
5. Bendayan, M., Gingras, D., Charest, P. (1986) Distribution of endogenous albumin in the glomerular wall of streptozotocin-induced diabetic rats as revealed by high-resolution immunocytochemistry, *Diabetologia*, **29**, 868-875.
6. Pappenheimer, J.R. (1953) Passage of molecules through capillary walls, *Physiol. Rev.*, **33**, 387-423.
7. Brenner, B.M., Hostetter, T.H., Humes, H.D. (1978) Molecular basis of proteinuria of glomerular origin, *N. Engl. J. Med.*, **298**, 826-833.

8. Ryan, G.B., Karnovsky, M.J. (1976) Distribution of endogenous albumin in the rat glomerular : Role of haemodynamic factors in glomerular barrier function, *Kidney Int.*, **9**, 36-45.
9. Brenner, B.M., Hostetter, T.H., Humes, H.D. (1978) Glomerular permselectivity: Barrier function based on discrimination of molecular size and charge, *Am. J. Physiol.*, **234**, F455-F460.
10. Hostetter, T.H. (1986) Diabetic nephropathy. In: *Brenner B.M., Rector F.C.*, eds The Kidney, Ardmore Medical Books, Philadelphia, pp. 1377.
11. Viberti, G.D., MacKintosh, D., Keen, H. (1983) Determinants of the penetration of proteins through the glomerular barrier in insulin-dependent diabetes mellitus, *Diabetes*, **32**, (Suppl 2) 92-95.
12. Ditzel, J., Junker, K. (1973) Abnormal glomerular filtration rate, renal plasma flow and renal protein excretion in recent and short-term diabetes, *Br. Med. J.*, **II**, 13-19.
13. Chistiansen, J.S., Gammelgaard, J., Frandsen, M., Parving, H.H. (1981) Increased kidney size, glomerular filtration rate and renal plasma flow in short-term insulin-dependent diabetics, *Diabetologia*, **20**, 451-456.
14. Bunn, H.F., Gabbay, K.H., Gallop, P.M. (1978) The glycosylation of hemoglobin: Relevance to diabetes mellitus, *Science*, **200**, 21-27.
15. Dolhofer, R., Weiland, O.H. (1980) Increased glycosylation of serum albumin in diabetes mellitus, *Diabetes*, **29**, 417-422.

16. McFarland, K.F., Catalano, E.W., Day, J.F., Thorpe, S.R., Baynes, J.W. (1979) Nonenzymatic glycosylation of serum proteins in diabetes mellitus, *Diabetes*, **28**, 1011-1014.
17. Guthrow, C.E., Morris, M.A., Day, J.F., Thorpe, S.R., Baynes, J.W. (1979) Enhanced nonenzymatic glycosylation of human serum albumin in diabetic mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4248-4261.
18. Day, J.F., Ingelbretsen, C.G., Ingelbretsen, W.R., Baynes, J., Thorpe, S.R. (1980) Nonenzymatic glycosylation of serum proteins and hemoglobin: Response to changes in blood glucose levels in diabetic rats, *Diabetes*, **29**, 524-527.
19. Cohen, M.P., Urdanivia, E., Surma, M.L., Wu, V.Y. (1980) Increased glycosylation of glomerular basement membrane collagen in diabetes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 765-769.
20. Trueb, B., Fluckiger, R., Winterhalter, K.H. (1984) Nonenzymatic glycosylation of basement membrane collagen in diabetes mellitus, *Coll. Rel. Res.*, **4**, 239-251.
21. Garlick, R.L., Bunn, H.F., Spiro, R.G. (1988) Nonenzymatic glycation of basement membranes from human glomeruli and bovine sources, *Diabetes*, **37**, 1144-1150.
22. Bendayan, M. (1998) Immunocytochemical detection of advanced glycated end products in rat renal tissue as function of age and diabetes, *Kidney Int.*, **54**, 438-447.

23. Farquhar, M.G., Hopper, J., Moon, H.D. (1959) Diabetic glomerulosclerosis; electron and light microscopic studies, *Am. J. Pathol.*, **35**, 721-753.
24. Hirose, K., Østerby, R., Nozawa, M., Gundersen, H.J.G. (1982) Development of glomerular lesions in experimental long-term diabetes in the rat, *Kidney Int.*, **21**, 689-695.
25. Bendayan, M. (1985) Alteration in the distribution of type IV collagen in glomerular basal lamina in diabetic rats as revealed by immunocytochemistry and morphometrical approach, *Diabetologia*, **28**, 373-378.
26. Østerby, R. (1986) Structural changes in the diabetic kidney, *Clin. Endocrinol. Metab.*, **15**, 733-751.
27. Desjardins, M., Bendayan, M. (1990) Ultrastructural distribution of glomerular basement membrane components in experimental diabetes, *Diabetes Research*, **14**, 65-73.
28. Beisswenger, P.J., Spiro, R.G. (1970) Human glomerular basement membrane: Chemical alteration in diabetes mellitus, *Science*, **168**, 596-598.
29. Pathasarathy, N., Spiro, R.G. (1982) Effect of diabetes on the glycosaminoglycan component of the human glomerular basement membrane, *Diabetes*, **31**, 738-741.

30. van den Born, J., van Kraats, A.A., Bakker, M.A.H., Assmann, K.J.M., van den Heuvel, L.P.W.J., Veerkamp, J.H., Berden, J.H.M. (1995) Selective proteinuria in diabetic nephropathy in the rat is associated with a relative decrease in glomerular basement membrane heparan sulphate, *Diabetologia*, **38**, 161-172.
31. Wu, K., Setty, S., Mauer, S.M., Killen, P., Nagase, H., Michael, A.F., Tsilibary, E.C. (1997) Altered kidney matrix gene expression in early stages of experimental diabetes, *Acta. Anat.*, **158**, 155-165.
32. Fukui, M., Nakamura, T., Ebihara, I., Shirato, I., Tomino, Y., Koide, H. (1992) ECM gene expression and its modulation by insulin in diabetic rats, *Diabetes*, **41**, 1520-1527.
33. Yang, C.W., Hattori, M., Vlassara, H., He, C.J., Carome, M.A., Yamato, E., Elliot, S., Striker, G.E., Striker, L.J. (1995) Overexpression of transforming growth factor-beta 1 mRNA is associated with up-regulation of glomerular tenascin and laminin gene expression in nonobese diabetic mice, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **5**, 1610-1617.
34. Park, I.S., Kiyomoto, H., Abboud, S.L., Abboud, H.E. (1997) Expression of transforming growth factor-beta and type IV collagen in early streptozotocin-induced diabetes, *Diabetes*, **46**, 473-480.
35. Moriya, T., Nakazawa, K., Ittoh, N., Shigematsu, H., Okada, N., Aizawa, T., Yamada, T., Yajima, Y. (1993) Loss of glomerular anionic sites and the development of albuminuria in rats with streptozotocin-induced diabetes, *Nephron*, **65**, 444-448.

36. Chiarelli, F., Verrotti, A., Mohn, A., Morgese, G. (1997) The importance of microalbuminuria as an indicator of incipient diabetic nephropathy: Therapeutic implications, *Ann. Med.*, **29**, 439-445.
37. Deckert, T., Feldt-Rasmussen, B., Djurup, R., Deckert M. (1988) Glomerular size and charge selectivity in insulin-dependent diabetes mellitus, *Kidney Int.*, **33**, 100-106.
38. Viberti, G.C., Wiseman M.J. (1986) The kidney in diabetes: Significance of the early abnormalities, *Clin. Endocrinol. Metab.*, **15**, 753-782.
39. Cotran, R.S., Karnovsky, M.J. (1967) Vascular leakage induced by horseradish peroxidase in rat, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **126**, 557-561.
40. Simionescu, N. (1979) Enzymatic tracers in the study of vascular permeability, *J. Histochem. Cytochem.*, **27**, 1120-1130.
41. Villaschi, S., Johns, L., Cirigliano, M., Pietra, G.G. (1986) Binding and uptake of native glycosylated albumin-gold complexes in perfused rat lungs, *Microvascular Research*, **32**, 190-100.
42. Ghitescu, L., Bendayan, M. (1992) Transendothelial transport of serum albumin: A quantitative immunocytochemical study, *J. Cell. Biol.*, **117**, 745-755.
43. Bendayan, M., Rasio, E.A. (1996) Transport of insulin and albumin by the microvascular endothelium of rete mirabile, *J. Cell. Sci.*, **109**, 1857-1864.

44. Mc Lean, I.W., Nakane, P.K. (1974) Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixative for immunoelectron microscopy, *J. Histochem. Cytochem.*, **22**, 1077-1083.
45. Bendayan, M. (1995) Colloidal gold post-embedding immunocytochemistry, *Prog. Histochem. Cytochem.*, **29**, 1-163.
46. Hardwicke, J., Squire, J.R. (1955) The relationship between plasma albumin concentration and protein excretion in patients with proteinuria, *Clin. Sci.*, **14**, 509-530.
47. Schleicher, E.D., Olgemöller, B. (1992) Glomerular changes in diabetes mellitus, *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **30**, 635-640.
48. Cohen, M.P., Surma, M.L., Wu, V.Y. (1982) In vivo biosynthesis and turnover of glomerular basement membrane in diabetes, *Am. J. Physiol.*, **242**, F385-F389.
49. Suzuki, D., Miyazaki, M., Jinde, K., Koji, T., Yagame, M., Endoh, M., Nomoto, Y., Sakai, H. (1997) In situ hybridization studies of matrix metalloproteinase-3 tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and type IV collagen in diabetic nephropathy, *Kidney Int.*, **52**, 111-119.
50. Inoue, S., Bendayan, M. (1995) High-resolution ultrastructural study of the rat glomerular basement membrane in long-term experimental diabetes, *Ultrastruct. Pathol.*, **19**, 175-185.

51. Rohrbabach, D.H., Wagner, C.W., Star, V.L., Martin, G.R., Brown, K.S., Yoon, J.W. (1983) Reduced synthesis of basement membrane heparan sulfate proteoglycans in diabetic mice, *J. Biol. Chem.*, **258**, 11672-11677.
52. Kanwar, Y.S., Rosenzweig, L.J., Linker, A., Jakubowski, M.L. (1983) Decreased de novo synthesis of glomerular proteoglycans in diabetes: Biochemical and autoradiographic evidence, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **80**, 2272-2275.
53. Hostetter, T.H., Troy J.L., Brenner, B.M. (1981) Glomerular hemodynamics in experimental diabetes mellitus. *Kidney. Int.* **19**, 410-415.
54. Anderson, S., Brenner, B.M. (1988) Pathogenesis of diabetic glomerulopathy: Haemodynamic considerations, *Diabetes/Metabolism Rev.*, **4**, 163-177.
55. Castellino P., Shohat J., DeFronzo, R.A. (1990) Hyperfiltration and diabetic nephropathy: Is it the beginning? or is it the end?, *Semin. Nephrol.*, **10**, 228-241.
56. Williams, S.K., Devenny, J.J., Bitensky, M.W. (1981) Micropinocytic injection of glycosylated albumin by isolated microvessels. Possible role in pathogenesis of diabetic microangiopathy, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **178**, 2393-2397.
57. Wieland, O.H. (1983) Protein modification by non enzymatic glucosylation: Possible role in the development of diabetic complications, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **29**, 125-131.

- 58.Sampietro, T., Colantuoni, A., Lenzy, S., Bertuglia, S., Bionda, A., Donato, L. (1987) Increased permeability of hamster microcirculation to glycosylated albumin, *The Lancet*, **31**, 994-996.
- 59.Daniels, B.S., Hausser, E.B. (1992) Glycation of albumin, not glomerular basement membrane, alter permeability in an in vitro model, *Diabetes*, **41**, 1415-1421.
- 60.Sabbatini, M., Sansone, G., Uccello, F., Giliberti, A., Conte, G., Andeucci, V.E. (1992) Early glycosylation products induce glomerular hyperfiltration in normal rats, *Kidney Int.*, **42**, 875-881.
- 61.Londoño, I., Ghitescu, L., Bendayan, M. (1995) Glomerular handling of circulating glycated albumin in the normal mouse kidney, *Am. J. Physiol.*, **268**, F913-F921.
- 62.Bendayan, M., Londoño, I. (1996) Reabsorption of native and glycated albumin by renal proximal tubular epithelial cells, *Am. J. Physiol.*, **271**, F261-F268.
- 63.Cohen, M.P., Ziyadeh, F.N. (1994) Role of Amadori-modified nonenzymatically glycated serum proteins in the pathogenesis of diabetic nephropathy, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **7**, 183-190.
- 64.Ziyadeh, F.N., Cohen, M.P. (1993) Effects of glycated albumin on mesangial cells: Evidence for a role in diabetic nephropathy, *Mol. Cell Biochem.*, **125**,19-25.

- 65.Higgins, P.J., Bunn, H.F. (1981) Kinetic analysis of nonenzymatic glycosylation of hemoglobin, *J. Biol. Chem.*, **256**, 5204-5208.
- 66.Shima, K., Shi, K., Noma, Y. (1991) High performance liquid chromatographic assay of rat serum glycated albumin, *Diabetes*, **40**, [suppl 1]:205A (abstract).
- 67.Neuman, R.G., Hud, E., Cohen, M.P. (1994) Glycated albumin: A marker of glycaemic status in rats with experimental diabetes, *Laboratory Animals*, **28**, 63-69.
- 68.Bakala, H., Verbeke, P., Perichon, M., Corman, B., Schaefferbeke, J. (1995) Glycation of albumin with aging and diabetes in rats : changes in its renal handling, *Mechanisms Ageing Develop.*, **78**, 63-71.
- 69.Ghiggeri, G.M., Candiano, G., Delfino, G., Bianchini, F., Queirolo, C. (1984) Glycosyl albumin and diabetic microalbuminuria: Demonstration of an altered renal handling, *Kidney Int.*, **25**, 565-570.
- 70.Shaklai, N., Garlick, R.L., Bunn, H.F. (1984) Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function, *J. Biol. Chem.*, **259**, 3812-3817.
- 71.Layton, G.J., Jerums, G. (1988) Effect of glycation of albumin on its renal clearance in normal and diabetic rats, *Kidney Int.*, **33**, 673-676.

Table 1: Characteristics of the control and diabetic rats.

Length of time		Weight (g)	Plasma glucose levels (mmol/l)	Plasma insulin levels (μ U/ml)	GBM thickness (nm)
10 days	control	160 \pm 2	6.9 \pm 0.61	28.0 \pm 4.0	240 \pm 39
	diabetic	148 \pm 2	26.7 \pm 1.2†	29.0 \pm 0.5	240 \pm 17
2 months	control	405 \pm 5	7.5 \pm 0.25	66.0 \pm 11.0	230 \pm 23
	diabetic	286 \pm 26†	30.7 \pm 0.7†	32.0 \pm 3.0†	222 \pm 35
4 months	control	566 \pm 17	6.0 \pm 0.2	43.5 \pm 7.0	220 \pm 35
	diabetic	290 \pm 25†	28.9 \pm 1.2†	31.5 \pm 7.0†	260 \pm 35*
6 months	control	750 \pm 25	6.1 \pm 0.89	30.9 \pm 3.3	270 \pm 28
	diabetic	187 \pm 17†	31.2 \pm 1.2†	18.5 \pm 0.5†	320 \pm 35*

mean values \pm s.e.m., n = 3 – 5 animals

*p<0.05; † p<0.001

Legends for figures

Fig. 1. Immuno-electron microscopy of endogenous albumin.

(A) Renal tissue of a two-month-old normoglycemic animal. The glomerular wall appears normal with a thin glomerular basement membrane (GBM). The immunolabeling by gold particles, revealing albumin antigenic sites over the GBM, is mainly located over the subendothelial side. Flocculent material present in the capillary lumen (CL) is also labeled. The urinary space (US) as well as podocytes (P), are almost free of labeling.

(B) Renal tissue of a two-month old hyperglycemic animal. The glomerular wall shows no significant morphological changes. GBM displays a normal thickness. Gold particles are present over the subendothelial as well as the central and subepithelial side of the GBM.

(C) Renal tissue of a two-month old streptozotocin-injected insulin-treated animal. The labeling by gold particles is located mainly over the subendothelial side of the GBM.

(A X 50 000; B X 44 500; C X 49 000)

Fig. 2. Morphometrical analysis of albumin distribution.

Distribution of rat albumin immunolabelings in the glomerular basement membrane of normoglycemic and streptozotocin-injected hyperglycemic animals as expressed in ratio values $R = [\text{distance (Endothelium-gold particle)}/\text{distance (Endothelium-$

Epithelium)]. The histograms of all control animals (A,C,E,G) show asymmetrical distributions of the labeling, with peaks in the region corresponding to the subendothelial side of the glomerular basement membrane. For the streptozotocin-injected hyperglycemic animals (B,D,F,H), the distributions of the labeling appear significantly shifted to the right.

Fig.3. Morphometrical analysis of albumin distribution.

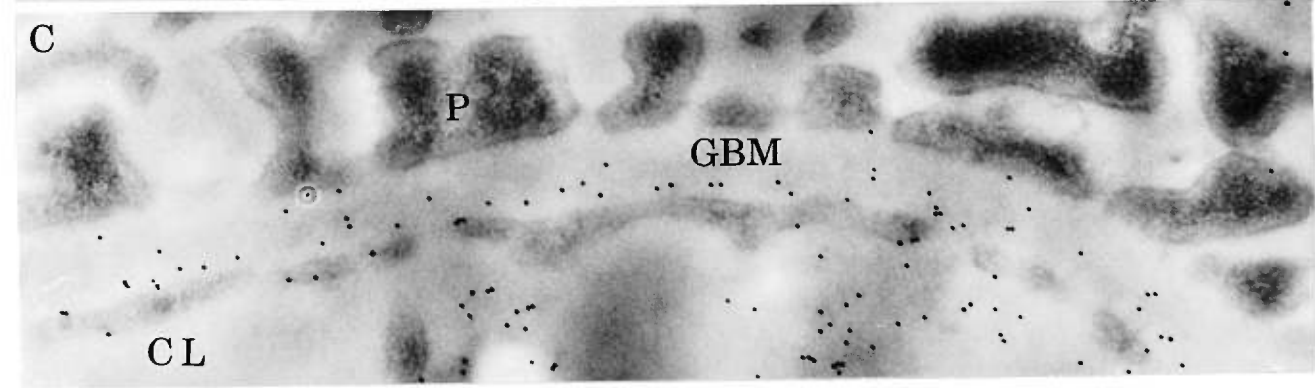
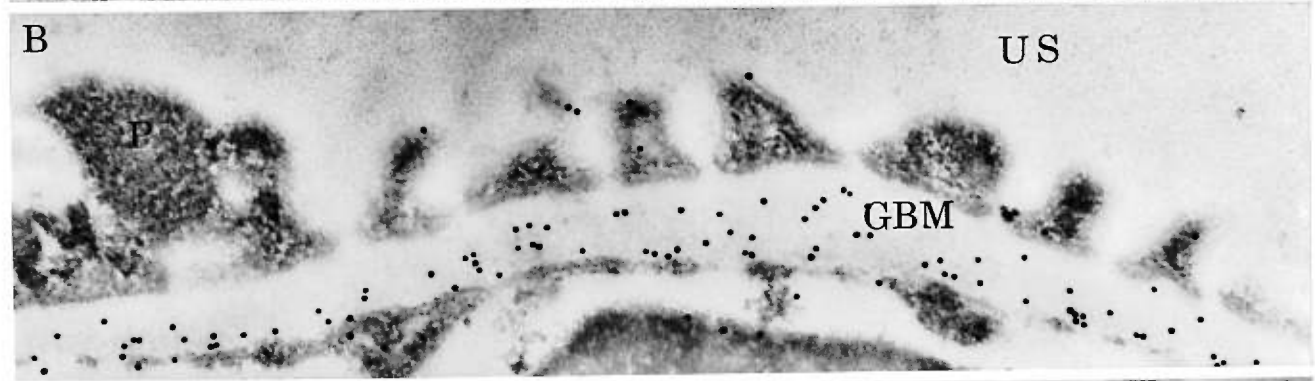
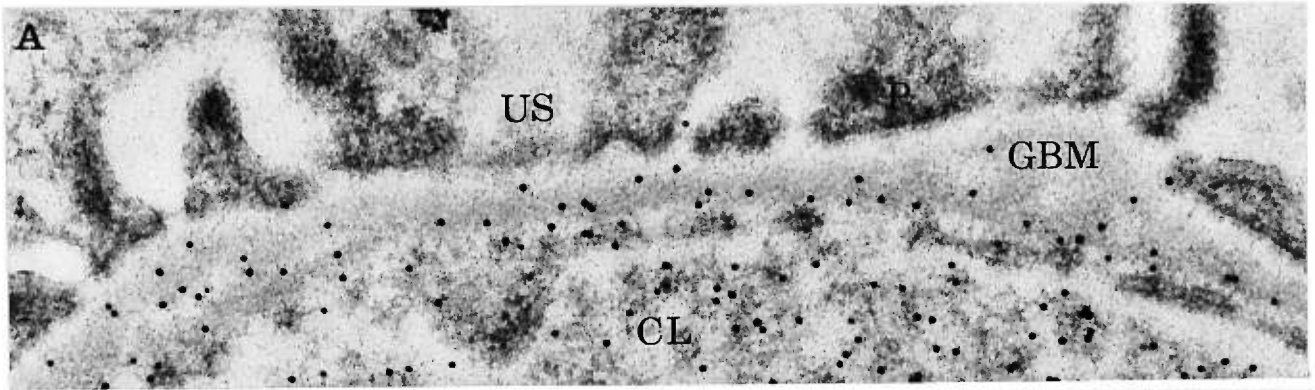
Distribution of rat albumin immunolabeling in the glomerular basement membrane of streptozotocin-injected hyperglycemic animals (3A) and streptozotocin-injected insulin-treated animals (3B) as expressed in ratio values (R). The histogram of the streptozotocin-injected insulin-treated animals (3B), is similar to that of the normoglycemic animals (2C) but differs significantly from that of the age-matched hyperglycemic animals (3A).

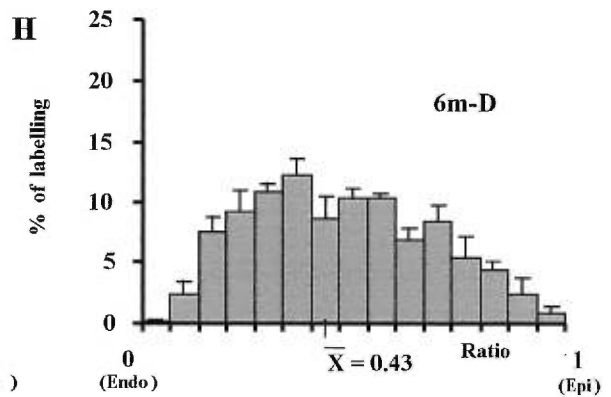
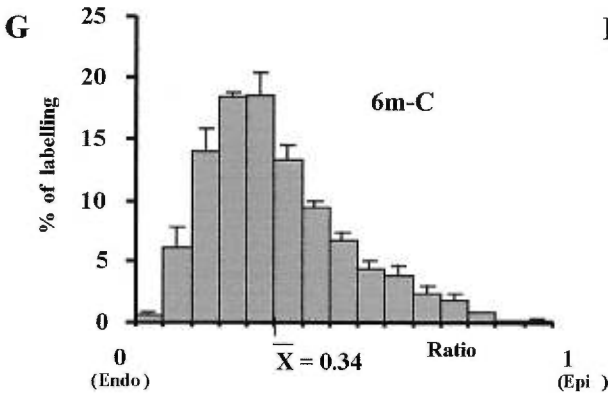
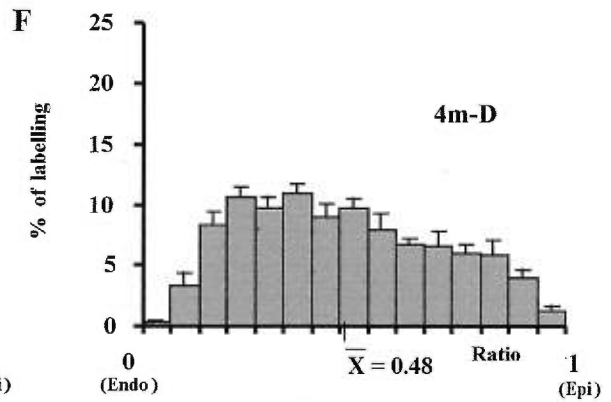
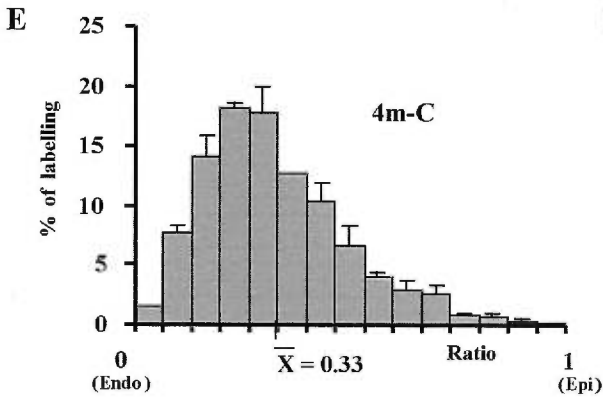
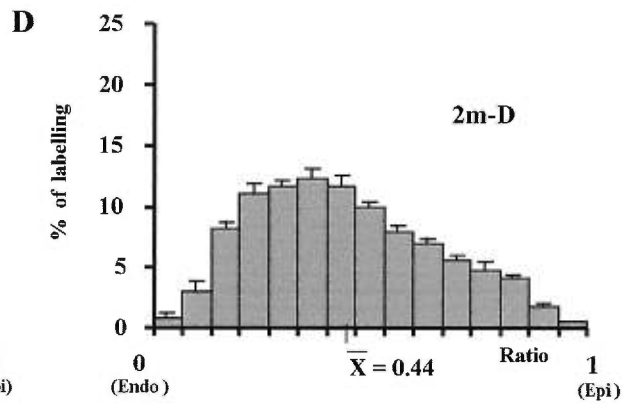
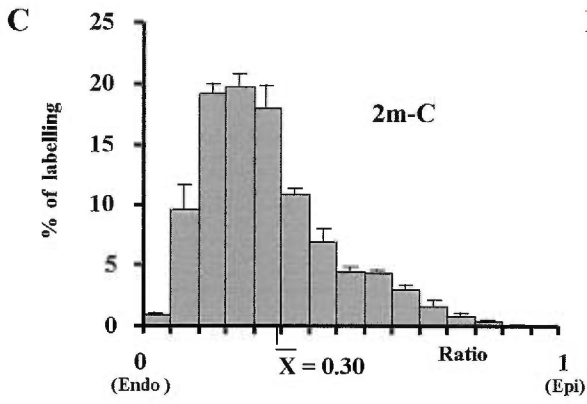
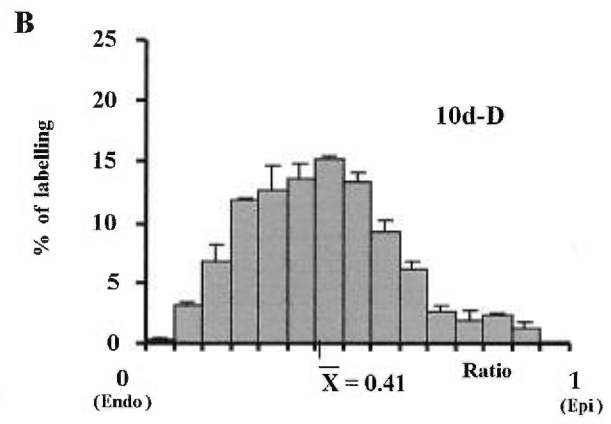
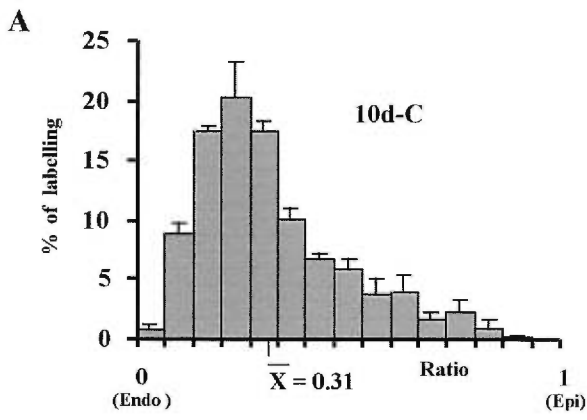
Fig. 4 Immuno-electron microscopy and morphometric analysis of type IV collagen.

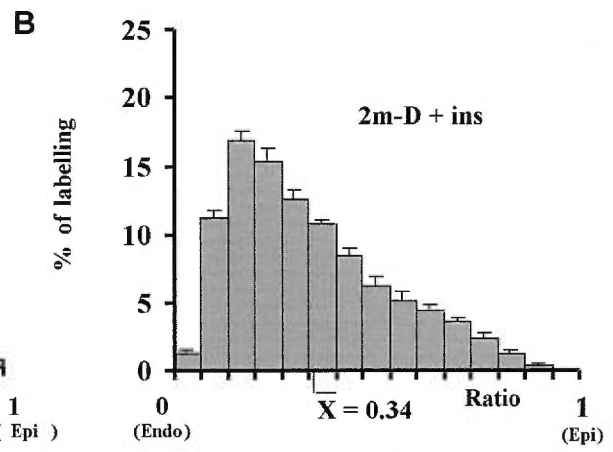
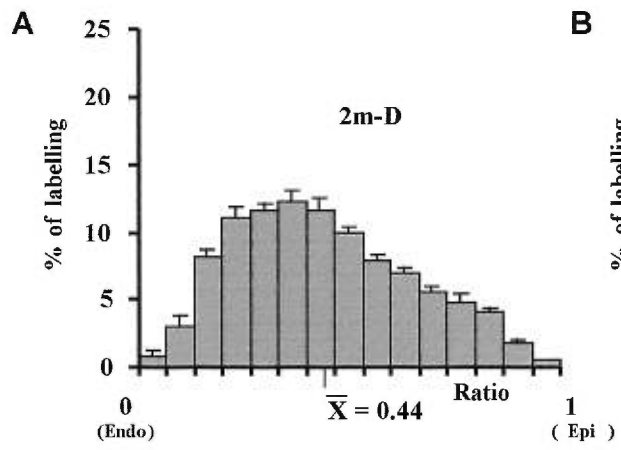
Immunolabelings for type IV collagen in the glomerular basement membrane of two-month normoglycemic (A) and two- (B) and four-month (C) streptozotocin-injected hyperglycemic animals. Labeling by gold particles is concentrated on the central lamina densa for the normoglycemic and hyperglycemic animals up to two months. In contrast, tissues from the four-month hyperglycemic animals display significant changes with labelings

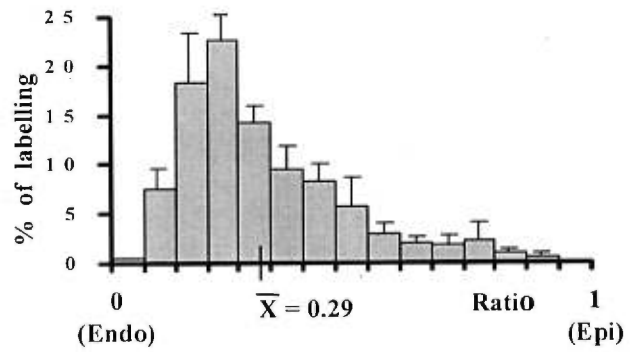
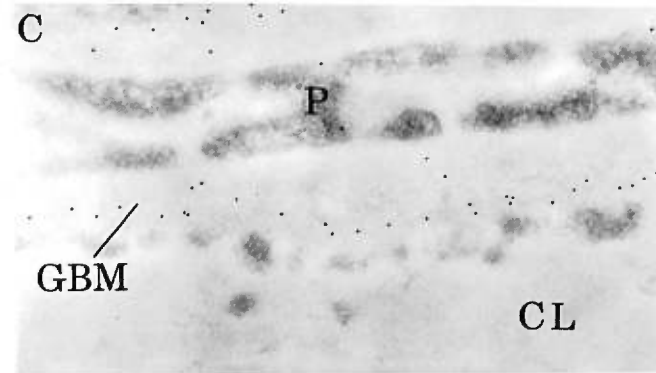
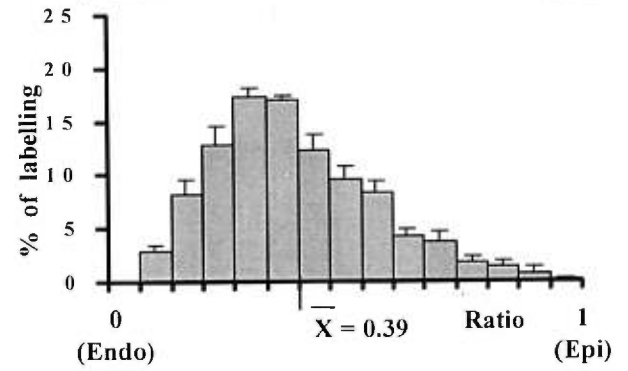
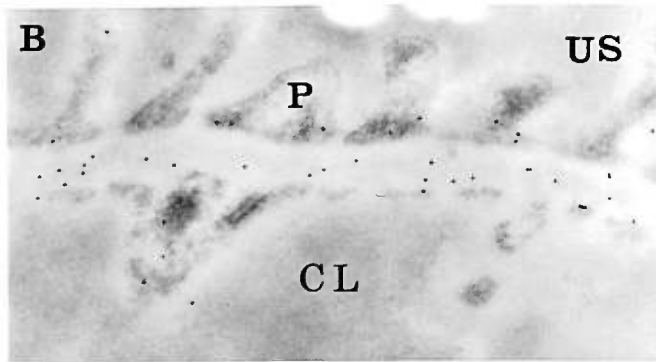
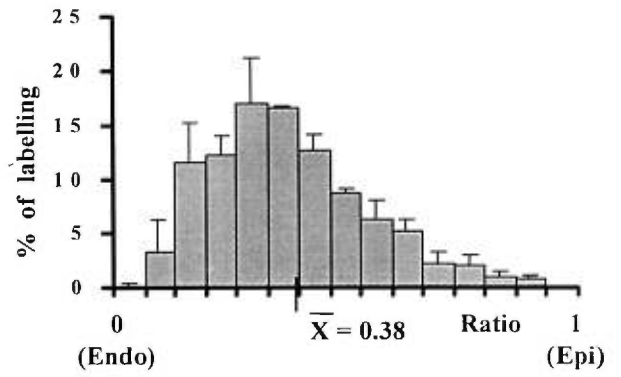
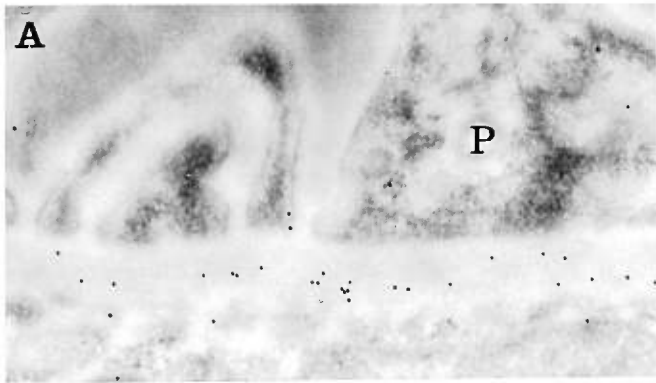
located towards the subendothelial side of the GBM. The distribution of the labeling, as expressed in ratio (R) values, reported in corresponding histograms, demonstrate significant changes only in tissues of four-month hyperglycemic animals.

(A X 39 000; B X 32 000; C X 30 000)









DISCUSSION

Au cours du diabète, la perméabilité glomérulaire est altérée. Cette altération se traduit par le passage des macromolécules (exemple : albumine, IgG) au travers la paroi glomérulaire (Bendayan et coll., 1986; Desjardins et Bendayan, 1989) et éventuellement, par une augmentation de la quantité de protéines dans l'urine (Hostetter, 1986; Viberti et coll., 1983). Chez un sujet diabétique, la perte de la fonction glomérulaire est concomitante aux modifications des propriétés sélectives de la paroi glomérulaire (Deckert et coll., 1988). Jusqu'à présent, très peu d'études ont investigué les altérations glomérulaires se produisant dans des stades précoces du diabète. Au cours de la présente étude, nous avons donc voulu vérifier si le stade précoce du diabète était caractérisé par la présence d'une altération au niveau de la perméabilité glomérulaire. De plus, nous avons vérifié si cette altération fonctionnelle était concomitante à des changements ultrastructuraux au niveau de la MBG. Dans un premier temps, nous avons étudié la perméabilité sélective de la paroi glomérulaire chez des animaux normoglycémiques, chez des animaux présentant un diabète précoce (rats hyperglycémiques pendant dix jours, deux, quatre et six mois) ainsi que chez des animaux hyperglycémiques traités à l'insuline (rats hyperglycémiques pendant deux mois puis traités par la suite à l'insuline pendant un mois). Pour ce faire, nous avons investigué le passage de l'albumine sérique au travers de la paroi glomérulaire en utilisant la technique d'immunocytochimie combinée à la protéine A-or en microscopie électronique. D'autres études ont aussi investigué, par approches morphologiques, les propriétés filtrantes de la paroi glomérulaire en utilisant des marqueurs exogènes denses aux

électrons. Cependant, ces approches sont confrontées à un sérieux problème dû à la nature non-physiologique des traceurs exogènes. En effet, il a été démontré que ceux-ci pouvaient induire des modifications hémodynamiques et modifier ainsi les propriétés filtrantes de la paroi glomérulaire (Cotran et Karnovski, 1967; Simionescu, 1979; Villasci et coll., 1986). La technique d'immunocytochimie en post-enrobage qui ne nécessite pas l'emploi de traceurs exogènes, est une approche beaucoup plus adéquate pour l'étude de la perméabilité glomérulaire car elle permet de révéler des protéines qui ont été fixées *in situ* dans des conditions d'équilibre physiologique (Mc Lean et Nakane, 1974; Bendayan, 1980). De plus, contrairement à la technique d'immunopéroxydase (Ryan et Karnovssky, 1976; Courtoy et coll., 1983; Laliberté et coll., 1978), l'utilisation de la protéine A-or permet, grâce aux particularités de l'or colloïdal, de révéler les sites antigéniques avec une très haute résolution et par le fait même d'effectuer des analyses morphométriques afin de déterminer la distribution de l'antigène à l'intérieur de la MBG. Les études antérieures ont montré que la distribution de l'albumine obtenue par cette technique est un très bon paramètre la perméabilité glomérulaire (Bendayan et coll., 1986). Finalement, contrairement aux études de clairance qui évaluent de façon concomitante la filtration glomérulaire ainsi que la réabsorption tubulaire (Hardwicke et Squire, 1955), la technique d'immunocytochimie à l'or colloïdal permet d'analyser uniquement les processus associés à la filtration glomérulaire.

Dans notre étude, nous avons utilisé le modèle de rat rendu expérimentalement diabétique par l'injection de la streptozotocine. Cette drogue détruit de façon

sélective les cellules bêtas du pancréas. Une seule dose de streptozotocine a permis d'induire l'état hyperglycémique chez les animaux. Ces animaux ont été très utilisés car ils développent les altérations caractéristiques de la glomérulopathie diabétique (Steffes et Mauer, 1984). De plus, étant donné qu'un faible nombre de cellules bêtas subsistent au traitement à la streptozotocine, les rats synthétisent une faible quantité d'insuline. Ces derniers, tout en restant fortement hyperglycémiques, sont viables sans apport supplémentaire d'insuline. Avant de sacrifier les animaux, le poids, la glycémie ainsi que les taux d'insuline circulante ont été mesurés. La glycémie des animaux hyperglycémiques (injectés par la streptozotocine) était significativement supérieure à celle des animaux normoglycémiques correspondants ainsi que des animaux hyperglycémiques traités à l'insuline. De plus, le poids et les taux d'insuline circulante des animaux hyperglycémiques étaient significativement inférieurs à ceux des animaux normoglycémiques correspondants. Les animaux diabétiques présentent aussi des symptômes reliés à l'hyperglycémie tel que la glycosurie et la protéinurie. Ces données révèlent l'état pathologique des animaux injectés par la streptozotocine.

L'examen du tissu rénal en microscopie électronique révèle les trois régions caractéristiques de la membrane basale glomérulaire: La *lamina rara interna* située du côté subendothélial de la MBG, la *lamina densa* au centre et la *lamina rara externa* située du côté subépithélial de la MBG. Les épaisseurs des membranes basales des animaux normoglycémiques et des animaux hyperglycémiques depuis deux mois sont similaires et celles-ci ne diffèrent pas significativement. Toutefois, l'épaisseur des MBG des animaux hyperglycémiques depuis quatre et six mois est

significativement augmentée comparativement à l'épaisseur de la MBG des animaux normoglycémiques correspondants. De plus, tel que décrit chez les animaux diabétiques depuis un an, nous observons une accumulation importante de matrice extracellulaire au niveau du mésangium chez les animaux hyperglycémiques depuis 6 mois (Bendayan et coll., 1986; Farquhar et coll., 1959; Østerby, 1986).

Au niveau du tissu rénal des animaux normoglycémiques, l'albumine sérique est retrouvée au niveau du matériel flocculent présent dans la lumière capillaire (protéines circulantes) ainsi qu'au niveau de la membrane basale glomérulaire. L'espace urinaire ne contient à peu près pas d'albumine. Au niveau de la MBG, l'albumine est surtout présente du côté subendothélial. Cependant, un faible marquage est aussi présent au niveau de la *lamina densa*. Le marquage au niveau de la *lamina rara interna* est presque complètement absent. Au niveau du tissu des animaux hyperglycémiques, le patron de marquage de l'albumine est similaire à celui des animaux normoglycémiques, cependant, le marquage est plus dense au niveau de la *lamina densa* et de la *lamina rara externa*. De plus, un marquage intense a été retrouvé au niveau de la région mésangiale. Chez les animaux hyperglycémiques traités à l'insuline, l'albumine est surtout présente du côté subendothélial de la MBG.

Les analyses morphométriques nous ont permis d'établir avec précision la distribution de l'albumine au travers la MBG des différents animaux. La distribution de l'albumine au niveau de la MBG des animaux normoglycémiques présente

systématiquement un pic du côté subendothélial de la MBG. Par ailleurs, la distribution de l'albumine chez les animaux hyperglycémiques est beaucoup plus étendue et le pic de ces distributions est déplacé vers le côté subépithélial de la MBG. Les analyses statistiques révèlent que déplacement de la distribution vers le côté subépithélial est significatif après seulement dix jours d'hyperglycémie. De plus, ce déplacement devient plus important avec la durée de l'état hyperglycémique. Finalement, la distribution de l'albumine au travers la MBG des animaux hyperglycémiques traités à l'insuline diffère significativement de celle obtenue pour les animaux hyperglycémiques correspondants mais ne diffère pas de celle obtenue pour les animaux normoglycémiques.

Dans un deuxième temps, nous avons vérifié s'il y avait présence de modifications structurales au niveau de la MBG à des temps précoces du diabète. Pour ce faire nous avons utilisé la technique d'immunocytochimie à l'or colloïdal afin de localiser les sites ultrastructuraux du collagène de type IV à l'intérieur de la MBG chez des animaux hyperglycémiques depuis deux et quatre mois, ainsi que chez les animaux normoglycémiques correspondants. Par la suite nous avons procédé aux analyses morphométriques afin d'analyser la distribution du collagène de type IV au travers la MBG des différents animaux. Le marquage du collagène de type IV au niveau du tissu rénal est restreint à la MBG et n'est pas présent au niveau de l'espace urinaire, de la lumière capillaire ou au niveau des cellules glomérulaires. Au niveau du tissu rénal des animaux hyperglycémiques de deux mois et des animaux normoglycémiques, la distribution du collagène de type IV est plutôt centrale avec un marquage intense au niveau de la *lamina densa*. Par ailleurs, au niveau du

tissu rénal des animaux hyperglycémiques depuis quatre mois, le collagène de type IV est majoritairement situé du côté subendothélial de la MBG et la distribution diffère significativement de celle des animaux hyperglycémiques de deux mois ainsi que de celle des animaux normoglycémiques.

Nos résultats démontrent que dans des conditions normales, l'albumine est majoritairement retenue du côté subendothélial de la MBG. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans d'autres études (Bendayan et coll., 1986). Par ailleurs, chez les animaux hyperglycémiques, incluant ceux à dix jours d'hyperglycémie, l'albumine n'est plus retenue de façon préférentielle du côté subendothélial et traverse la MBG vers l'espace urinaire. L'altération de la perméabilité glomérulaire avait déjà été observée chez des animaux diabétiques de un an (Bendayan et coll., 1986). Nos résultats démontrent que les propriétés sélectives de la MBG sont rapidement altérées au cours du diabète. Ces observations constituent un fait nouveau. En effet, bien qu'il ait été démontré que l'excrétion de l'albumine chez le rat est déjà significativement élevée après seulement quatre semaines d'hyperglycémie (Michels et coll., 1980), il n'a jamais été démontré directement l'altération de la perméabilité au niveau de la MBG dans des conditions d'hyperglycémie aussi précoces. D'autre part, nos résultats démontrent bien que l'altération de la perméabilité glomérulaire n'est pas la conséquence d'une action néphrotoxique de la streptozotocine, étant donné que suite à un traitement à l'insuline, nous observons un rétablissement des propriétés sélectives de la paroi glomérulaire. D'autres chercheurs ont aussi démontré l'absence d'un effet de la streptozotocine sur le développement des lésions

associées à la glomérulopathie diabétique (Rash, 1979a; 1980).

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, les propriétés sélectives de la paroi glomérulaire sont déterminées par plusieurs facteurs. Les propriétés de la MBG basées sur la taille et la charge sont des facteurs importants qui influencent la filtration des macromolécules (Brenner et coll., 1978; Batsford et coll., 1987). Certains facteurs hémodynamiques régulent aussi la filtration glomérulaire (Brenner et coll., 1971; Robertson et coll., 1972). D'autre part, la forme et la conformation des molécules filtrées influencent leur passage au travers la paroi glomérulaire (Bohrer et coll., 1979; Rennke et Venkatachalam, 1979). Nous croyons donc que l'altération précoce de la fonction glomérulaire chez les animaux hyperglycémiques est associée à la modification d'un ou de plusieurs de ces déterminants.

Au cours du diabète avancé, la perte de la perméabilité glomérulaire, est concomitante aux altérations biochimiques et biophysiques de la MBG. L'épaississement de la MBG constitue l'altération structurale la plus commune de la glomérulopathie diabétique (Rash, 1979a; Østerby, 1986; Hirose et coll., 1982; Bendayan et coll., 1986). L'épaississement de la MBG résulte d'une augmentation de la synthèse de ses composants structuraux ainsi que de la réduction de leur renouvellement (Cohen et coll., 1982). Certaines études ont démontré une augmentation de la synthèse du collagène de type IV et VI, de la laminine, de la fibronectine (Mohan et coll., 1990; Simionescu et Spiro, 1987; Suzuki et coll., 1997) ainsi que de certains inhibiteurs des métalloprotéinases (Suzuki et coll., 1997) dans le glomérule au cours du diabète. Parallèlement, les taux d'expression des

métalloprotéinases sont diminués (Suzuki et coll., 1997). D'autres facteurs contribuent aussi à l'accumulation des constituants de la MBG au cours du diabète. En outre, il est connu que l'accumulation des AGEs au niveau de la MBG d'animaux diabétiques diminue la vitesse de renouvellement des constituants structuraux de la MBG (Brownlee et coll., 1988; Bendayan, 1998). En effet, la présence des AGEs au niveau du collagène de type IV bloque les sites d'attaque enzymatique et par le fait même, le collagène de type IV devient plus résistant à la dégradation par les collagénases (Brownlee et coll., 1983).

Malgré que l'augmentation de l'expression des ARNm pour le TGF- β , pour la laminine, ainsi que pour le procollagène de type IV est observé très rapidement après l'induction du diabète (Fukui et coll., 1992; Wu et coll., 1997; Park et coll., 1997), l'accumulation comme tel des protéines ultrastructurales de la MBG au cours des trois premiers mois d'hyperglycémie n'est pas encore bien démontrée. Dans notre étude, l'épaississement de la MBG a été observé après quatre mois d'hyperglycémie. L'épaississement de la MBG se produit donc bien après l'altération de ses propriétés filtrantes. Bien que la relation entre l'épaississement de la GBM et la protéinurie ne soit pas encore très bien établie chez l'humain, nos résultats suggèrent que l'épaississement ne contribue pas de façon significative à la perte des propriétés filtrantes de la MBG. Cette conclusion confirme les résultats obtenus par Desjardins et Bendayan. Ces derniers ont démontré que le simple épaississement de la GBM, n'était pas suffisant pour expliquer la perte de la perméabilité glomérulaire au cours du diabète (Desjardins et Bendayan, 1989). En effet, ils ont démontré que l'épaississement de la MBG qui s'effectue aussi avec l'âge

n'est pas associé avec une modification de propriétés de filtration de la MBG.

Dans notre étude, nous avons montré qu'à quatre mois d'hyperglycémie, il y avait en plus de l'épaississement de la MBG, un changement dans la distribution du collagène de type IV. En effet, dans le tissu rénal de rats normaux et de rats hyperglycémiques depuis deux mois, le collagène de type IV est principalement localisé au niveau de la région subendothéliale de la *lamina densa*. Cependant, au niveau du tissu rénal d'animaux hyperglycémiques depuis quatre mois, le marquage du collagène de type IV est majoritairement localisé du côté subendothélial de la *lamina rara interna*. Cette modification structurale a été observée chez des animaux diabétiques avancés (Bendayan, 1985; Desjardins et Bendayan, 1990). Nos résultats suggèrent que la distribution du collagène de type IV dans la MBG est modifiée de façon concomitante à l'épaississement de la MBG dans des stades précoces du diabète (après quatre mois d'hyperglycémie). Pour expliquer ce résultat, Desjardins et Bendayan ont suggéré qu'au cours de l'épaississement de la MBG, le collagène de type IV serait masqué par l'accumulation d'autres constituants différents du collagène de type IV. Il se pourrait aussi que ce résultat reflète une modification particulière dans la composition du collagène IV (Desjardins et Bendayan, 1990). En utilisant des anticorps spécifiques contre les différentes chaînes du collagène de type IV, Desjardins et ses collaborateurs ont démontré que la composition moléculaire du collagène de type IV était modifiée au cours du diabète avancé. En effet, les chaînes α_1 et α_2 qui sont localisées du côté subendothélial de la MBG chez l'animal normal, sont retrouvées dans toute l'épaisseur de la MBG chez l'animal

diabétique (Desjardins et coll., 1990). Dans cette étude, la modification de la conformation moléculaire est concomitante à la perte de la fonction glomérulaire. En modifiant la composition moléculaire du collagène de type IV, il est possible que la structure tri-dimensionnelle et la conformation de la matrice soient alors altérées et que les propriétés fonctionnelles de celle-ci soient par le fait même modifiées. Dans ce sens, Inoue et Bendayan ont montré qu'en effet, l'architecture de la MBG est modifiée chez des animaux diabétiques avancés (Inoue et Bendayan, 1995). D'autre part, les études sur le développement ontogénique de la GBM chez le rat suggèrent fortement que l'organisation des différentes molécules de collagène de type IV à l'intérieur de la MBG, est nécessaire à l'établissement des propriétés fonctionnelles de celle-ci. Toutefois, nos résultats démontrent que l'altération de la distribution du collagène de type IV, n'est pas corrélée avec l'altération des propriétés sélectives de la MBG dans des stades précoces du diabète. En effet, malgré l'altération de la distribution de l'albumine à dix jours et à deux mois d'hyperglycémie, nous n'observons aucune altération de la distribution du collagène de type IV. Par contre, nos résultats démontrent que l'altération de la distribution du collagène de type IV ainsi que l'épaississement de la MBG, sont associés avec une augmentation de l'altération de la perméabilité glomérulaire après quatre et six mois d'hyperglycémie. Ainsi, bien que ces modifications structurales ne semblent pas impliquées dans l'initiation de l'altération fonctionnelle du glomérule, nous croyons qu'elles contribuent de façon importante au développement de l'albuminurie et des lésions fonctionnelles au niveau du glomérule au cours du diabète. En contre partie, malgré le fait que nous n'ayons pas observé de modifications structurales au niveau de la MBG dans des temps précoces du

diabète, nous n'écartons pas la possibilité que certaines modifications, plus subtiles puissent tout de même être présentes, mais que la sensibilité de notre méthode ne permette pas de détecter ces modifications. En fait, en utilisant la technique de marquage à l'immunopéroxydase, Park et ses collaborateurs ont observé une augmentation significative de la quantité de collagène IV après seulement sept jours suivant l'induction du diabète chez le rat (Park et coll., 1997). Malgré que nous n'ayons pas observé un épaissement de la membrane basale glomérulaire dans des temps aussi précoces du diabète, nous n'écartons pas la possibilité que que cette augmentation de la quantité du collagène de type IV coïncide avec une augmentation de l'épaisseur de la membrane basale glomérulaire. Il est possible que notre technique ne soit pas assez sensible pour détecter des épaissements subtiles de la MBG. En utilisant la méthode de cryofracture et de cryodécoupage, Moriya et ses collaborateurs ont démontré que la largeur des pores formées par le réseau protéique à l'intérieur de la MBG était augmentée chez l'animal diabétique depuis un mois (Moriya et coll., 1996). Il est possible que ces changements subtiles puissent être suffisants pour modifier la structure tridimensionnelle et les propriétés de filtration de la MBG pour l'albumine. D'un autre côté, des études physiologiques indiquent que la clairance fractionnelle du dextran neutre chez des animaux présentant un diabète précoce ainsi que chez des patients présentant une microalbuminurie, ne diffère pas de la clairance fractionnelle du dextran neutre mesurée chez des sujets normaux (Mogensen, 1971b; Pennell et coll., 1981; Michels et coll., 1982). De plus, la perméabilité de la paroi glomérulaire pour les IgG chez le rat, n'est pas altérée au cours des trois premiers mois suivant l'induction du diabète. Ces résultats suggèrent donc que les propriétés filtrantes de

la paroi glomérulaire basées sur la taille, ne sont pas modifiées de façon importante au début du diabète. La modification des propriétés filtrantes basées sur la taille se produit tardivement au cours du diabète, bien après la modification des charges de la MBG (Moriya et coll., 1993a).

La paroi glomérulaire comprend plusieurs sites chargés négativement. Ces sites anioniques jouent un rôle important dans la sélectivité de la paroi glomérulaire lors de la filtration. On distingue entre autre des groupes sialiques au niveau des membranes endothéliale et épithéliale (Blau et coll., 1973; Latta et coll., 1975; Charest et Roth, 1985; Bendayan et coll., 1990), des groupes carboxyles (Michael et coll., 1970; Mohos et coll., 1969; Seiler et coll., 1975; Seiler et coll., 1977) ainsi que les groupes sulfates (Caulfield et Farquhar, 1976, Kanwar et Farquhar, 1979a;) au niveau de la MBG. Cependant, le rôle définitif de chacun de ces composants anioniques n'est pas encore bien établi. On considère que le rôle des charges négatives au niveau de l'endothélium serait de limiter le passage des très grosses macromolécules circulantes et de prévenir ainsi le colmatage de la MBG. Les charges anioniques au niveau de l'épithélium et plus précisément au niveau des diaphragmes entre les podocytes auraient possiblement des rôles importants dans la sélectivité des petites molécules cationiques ainsi que dans la régulation du passage de l'eau (Daniels, 1993). Le rôle des cellules endothéliales et épithéliales dans la sélectivité de la filtration glomérulaire a longtemps été controversé. Cependant la membrane basale glomérulaire isolée et dénudée des cellules épithéliales et endothéliales, est beaucoup moins sélective que lorsque les cellules

sont présentes (Daniels et coll., 1993). De plus, l'injection d'anticorps spécifiques contre les protéines anioniques se trouvant au niveau des diaphragmes entre les podocytes, induit une protéinurie importante (Fujigaki et coll., 1998). Ces résultats démontrent aussi que les cellules épithéliales et la membrane basale glomérulaire agissent en concert afin de maintenir les propriétés sélectives de la paroi glomérulaire. Finalement, les charges anioniques au niveau de la MBG seraient impliquées dans la régulation du transport transglomérulaire des macromolécules anioniques et neutres (Ghitescu et coll., 1992). Les héparanes sulfates semblent être les principaux déterminants qui contribuent à maintenir les sites anioniques au niveau de la MBG (Kanwar et Farquhar, 1979b). Cependant, certains auteurs suggèrent que les sites anioniques de la MBG sont plutôt maintenus grâce aux groupes carboxyles (Bertolatus et Klinzman, 1991). D'autres études sont donc nécessaires afin d'éclaircir le rôle de chacun des constituants anioniques dans la perméabilité glomérulaire.

Plusieurs chercheurs ont observé une diminution de la quantité d'héparane sulfate dans la MBG chez l'humain (Parthasarathy et Spiro, 1982; Tamsma et coll., 1994) et chez l'animal (Rohrbach et coll., 1983; Kanwar et coll., 1983; van den Born et coll., 1995b) au cours du diabète. La quantité de groupes sialiques est aussi diminuée au cours du diabète (Westberg et Michael, 1973; Wahl et coll., 1982). Ainsi, les propriétés sélectives de la MBG basées sur la charge sont modifiées au cours du diabète. Ces modifications sont aussi concomitantes à la perte de la perméabilité glomérulaire. Toutefois, l'altération des charges anioniques au niveau de la paroi glomérulaire dans des stades précoces du diabète est encore

controversée. La quantité d'ARNm pour les HS diminue de façon significative après 1 mois suivant l'induction du diabète chez le rat (Fukui et coll., 1992). De plus, en utilisant des sondes cationiques tel que la polyéthylèneimine (PEI), Moriya a démontré une diminution significative des sites anioniques après seulement sept jours suivant l'administration de la streptozotocine chez le rat. Il montre de plus que cette altération se produit avant l'apparition de l'albuminurie dans l'urine (Moriya et coll., 1993b). Cette observation pourrait expliquer en partie nos résultats montrant l'altération de la perméabilité de la MBG après dix jours d'hyperglycémie. Cependant, cette hypothèse n'est que subjective, étant donné qu'aucune étude jusqu'à présent n'a réussi à montrer de façon satisfaisante une diminution significative de la quantité d'héparanes sulfates ou de groupements carboxyles dans des stades aussi précoces de la maladie. D'autre part, certaines observations suggèrent que l'altération des charges à l'intérieur de la MBG, n'est pas le seul facteur qui contribue à la perte de la perméabilité glomérulaire. En effet, lors d'exercices physiques modérés, on observe une alternance rapide entre l'apparition et la disparition de la microalbuminurie. Ce phénomène ne peut pas être expliqué par une altération au niveau des charges de la MBG car le processus est trop rapide (Vittinghus et Mogensen, 1982). De la même façon, chez un animal diabétique, la microalbuminurie disparaît très rapidement avec la normalisation de la glycémie. Ce phénomène est beaucoup trop rapide pour permettre à la MBG de renouveler ses sites anioniques (Viberti et coll., 1979) et cela malgré la vitesse de renouvellement élevée des glycosaminoglycanes (Cohen et Surma, 1981). Finalement, puisque l'augmentation de l'excrétion de l'albumine est inconstante au cours du diabète, la perte de la perméabilité glomérulaire ne peut pas être

expliquée uniquement que par la modification des charges dans la MBG (Rasch, 1980; Pennell et coll., 1981; Pennell et Meinking, 1982).

En résumé, dans des étapes avancées du diabète, il est évident que la modification des sites anioniques ainsi que l'altération de la structure architecturale de la MBG contribuent tous deux au développement de l'altération fonctionnelle du glomérule. Cependant, dans des étapes précoces de la maladie, soit suivant les dix premiers jours après l'induction du diabète, il est encore difficile de déterminer avec certitude la présence et la nature des modifications intrinsèques de la paroi glomérulaire qui pourraient potentiellement influencer la filtration sélective des macromolécules. Les données actuelles semblent montrer la présence d'une altération précoce au niveau des charges intrinsèques de la paroi glomérulaire, cependant ce facteur ne semble pas suffisant pour expliquer la perte de la perméabilité glomérulaire. D'un autre côté, les études physiologiques suggèrent que la perte de la perméabilité glomérulaire dans des stades précoces du diabète n'est pas associée à l'altération des propriétés sélectives de la MBG basées sur la taille.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les facteurs hémodynamiques sont des déterminants importants de la filtration glomérulaire. Il s'avère que très tôt au cours du diabète expérimental (après sept jours suivant l'induction du diabète), certains des facteurs hémodynamiques sont modifiés et la filtration glomérulaire est augmentée (Hostetter et coll., 1981; Garcia et coll., 1998; Michels et coll., 1980). L'augmentation de la filtration glomérulaire est aussi observée chez de jeunes

patients diabétiques (Christensen et coll., 1981; Hostetter et coll., 1982), et ces derniers excrètent une grande quantité d'urine comparativement à des individus normoglycémiques. L'étiologie exacte de l'hyperfiltration glomérulaire est plus ou moins comprise jusqu'à présent. Cependant, certains facteurs ont été investigués. L'injection de glucose dans un rat normal provoque une hyperfiltration, mais à un degré moindre que celle observée chez un animal diabétique (Brochner-Mortensen, 1973). On observe aussi une augmentation de certaines hormones tel que le glucagon qui ont une action positive sur la filtration glomérulaire (Unger, 1976) ainsi qu'une diminution de la sécrétion de rénine chez l'animal diabétique (Christlieb, 1974). De plus, on constate une diminution des récepteurs membranaires pour l'angiotensine II dans le glomérule des animaux diabétiques (Ballermann et coll., 1984). Dans notre étude, nous ne pouvons écarter la possibilité que certains facteurs hémodynamiques puissent être modifiés dans les dix premiers jours suivant l'induction du diabète et contribués ainsi à la perte de la perméabilité glomérulaire. Cependant, personne n'a encore établi de liens directs entre la perte de la perméabilité de la paroi glomérulaire et l'augmentation de la filtration glomérulaire au début du diabète. De plus, les études à ce sujet sont contradictoires. En effet, il apparaît que certains rats souffrant d'un diabète précoce, présentent un taux d'excrétion d'albumine et de dextran neutre normal malgré une augmentation de la filtration glomérulaire et de la vitesse du flux sanguin. Au contraire, d'autres animaux développent une protéinurie mais en gardant un taux de filtration glomérulaire toujours normal (Pennell et coll., 1981; Pennell et Meinking, 1982). De plus, la MBG peut supporter une certaine augmentation des forces de pression et de tension. À la lumière de ces

observations, il apparaît que l'hyperfiltration n'est pas un élément essentiel au développement de la protéinurie chez des rats diabétiques. Bien qu'il soit évident que l'hyperfiltration accélère le développement des lésions glomérulaires, nous ne croyons pas que ce facteur seul puisse contribuer à la perte des propriétés sélectives de la paroi glomérulaire dans des temps aussi courts que dix jours d'hyperglycémie. Ainsi, d'après nous, la perte de la perméabilité glomérulaire que nous observons après seulement dix jours d'hyperglycémie est plutôt associée à des facteurs qui sont extrinsèques à la paroi glomérulaire. Cette hypothèse est beaucoup plus compatible avec la vitesse à laquelle se développe l'altération fonctionnelle du glomérule au cours du diabète.

Les protéines sériques subissent très rapidement une glycosylation non-enzymatique lors de conditions hyperglycémiques. Par exemple, la glycosylation de l'albumine sérique s'effectue dans un délai de deux jours suivant l'augmentation de la glycémie (Day et coll., 1980). La glycosylation de l'albumine forme un produit d'Amadori. Ce dernier est la forme prédominante des protéines glyquées circulantes chez les sujets diabétiques. Les quantités de produits d'Amadori dans la circulation sont directement proportionnelles aux taux de glucose sanguin (Day et coll., 1980; Guthrow et coll., 1979; Neuman et coll., 1994). Cette relation linéaire est due au fait que ces produits d'Amadori présentent une demi-vie très courte (13 jours chez l'homme et 6 jours chez le rat) (Guthrow et coll., 1979; Shima et coll., 1991) et une vitesse de formation très rapide (Day et coll., 1980). De plus en plus d'études suggèrent l'implication des produits d'Amadori dans le développement de la microangiopathie et de la néphropathie diabétique (Renold et coll., 1978; Cohen

et Ziyadeh, 1996; Wieland, 1983). Des études *in vitro* (Smith et coll., 1989; Williams et coll., 1981) et *in vivo* (Villaschi et coll., 1986; Sampietro et coll., 1987; Poduslo et Curran, 1994) démontrent que l'albumine glyquée augmente la perméabilité vasculaire et suggèrent que l'altération de la perméabilité vasculaire au cours du diabète pourrait être reliée à la glycation des protéines circulantes.

Le rein constitue un très bon modèle dans l'étude du rôle de l'Amadori dans l'altération de la perméabilité vasculaire. L'albumine glyquée est préférentiellement excrétée dans l'urine comparativement à l'albumine native (Kowluru et coll., 1987; Ghiggeri et coll., 1984; Shaklai et coll., 1984; Layton et Jerums, 1988). Il semble que l'excrétion préférentielle de l'albumine glyquée soit due au fait que cette dernière est moins réabsorbée que l'albumine native au niveau des tubules proximaux (Ghiggeri et coll., 1984; Shaklai et coll., 1984; Bendayan et Londoño, 1996).

L'albumine glyquée semble aussi affecter directement la fonction glomérulaire. L'injection intraveineuse d'albumines glyquées chez des rats normaux induit une hyperfiltration glomérulaire (Sabbatini et coll., 1992). De plus, la normalisation de la glycémie rétablit les taux de filtrations glomérulaires (Jensen et coll., 1987). Toutes ces observations suggèrent que l'hyperfiltration glomérulaire semble être reliée à l'hyperglycémie. Il est donc possible que les quantités de produits d'Amadori dans la circulation dans des stades précoces du diabète, soient suffisantes pour induire l'hyperfiltration glomérulaire. D'autre part, l'albumine glyquée est préférentiellement filtrée au travers de la paroi glomérulaire (Daniels et coll., 1992; Londoño et coll.,

1995; Ghiggeri et coll., 1984). En effet, Daniels et ses collaborateurs montrent que le coefficient de filtration pour l'albumine glyquée au travers des membranes basales glomérulaires isolées est plus élevé que celui mesuré pour l'albumine native (Daniels et coll., 1992). De la même façon, lorsque l'albumine glyquée est injectée dans la circulation d'un animal normal, Londoño et coll., observent que celle-ci passe beaucoup plus aisément au travers la barrière glomérulaire que l'albumine native (Londoño et coll., 1995; Bendayan et Londoño, 1996). Ce phénomène est aussi observé avec la ferritine glyquée (Williams et Siegal, 1985). De plus, la présence de l'albumine glyquée dans la circulation d'un animal normal, augmente le passage de l'albumine native au travers la paroi glomérulaire (Londoño et coll., 1995; Bendayan et Londoño, 1996). Ces résultats démontrent que seule la présence de l'albumine glyquée dans la circulation est suffisante pour induire l'altération de la perméabilité glomérulaire. Afin d'expliquer l'augmentation du passage transglomérulaire de l'albumine native, Londoño et ses collaborateurs ont suggérés que l'albumine glyquée pourrait par un mécanisme encore inconnu, induire des altérations au niveau des propriétés sélectives de la paroi glomérulaire en interagissant avec les composants de la MBG. Par ailleurs, il semble que ces altérations ne soient que temporaires, étant donné que Londoño et coll. observent un rétablissement des propriétés sélectives de la paroi glomérulaire lorsque l'albumine glyquée est enlevée de la circulation (Londoño, communication personnelle).

Dans notre étude, nous assumons que les quantités d'albumine glyquée circulante (Amadori) sont déjà augmentées après dix jours d'hyperglycémie, malgré que nous

n'avons pas effectué d'évaluation quantitative (Day et coll., 1980; Higgins et Bunn, 1981; Neuman et coll., 1994). Nous suggérons donc que la présence de l'albumine glyquée dans le sang des animaux hyperglycémiques de dix jours pourrait possiblement augmenter la perméabilité de la paroi glomérulaire pour l'albumine native, et par le fait même, expliquer nos résultats du déplacement de la distribution de l'albumine vers le côté épithélial de la MBG chez ces animaux hyperglycémiques. Par ailleurs, dans notre étude, nous n'avons cependant pas pu distinguer de façon individuelle les distributions correspondantes pour l'albumine native et pour l'albumine glyquée étant donné que notre anticorps reconnaît les deux formes d'albumine.

Le mécanisme par lequel l'albumine glyquée traverse la paroi glomérulaire malgré les propriétés restrictives de la MBG (basées sur la charge et la taille) n'est pas encore bien compris. Plusieurs auteurs ont montré que le point isoélectrique (pI) de l'albumine était modifié au cours de la glycosylation non-enzymatique (Bundschuh et coll., 1992; Ghiggeri et coll., 1984; Kowluru et coll., 1987). En effet, l'albumine devient plus anionique une fois glyquée. Le passage de l'albumine glyquée au travers de la MBG devrait être plus restreint que le passage de l'albumine native, mais Londoño et coll. et Daniels et coll. observent le phénomène inverse (Londoño et coll., 1995; Daniels et coll., 1993). Ainsi, le pI ne semble pas contribuer à l'augmentation du passage de l'albumine glyquée au travers de la paroi glomérulaire. D'un autre côté, il est possible que la glycation non-enzymatique modifie le repliement et la conformation tri-dimensionnelle de l'albumine et que la forme modifiée de l'albumine glyquée puisse ainsi passer plus aisément que

l'albumine native au travers de la MBG (Daniels et coll., 1992; Kowluru et coll., 1987; Layton et Jerums, 1988). De plus, il semble que l'altération de la structure moléculaire de l'albumine glyquée modifie ses propriétés de liaison avec certains ligands et ceci pourrait influencer sa réabsorption au niveau des tubules rénaux (Shaklai et coll., 1987). Il s'avère que les protéines qui présentent une structure tertiaire altérée sont retrouvées en plus grande quantité dans l'urine de certains patients protéinuriques (Ghiggeri et coll., 1984). Cette conclusion a cependant été controversée (Murtiashaw et Winterhalter, 1986).

Les produits d'Amadori ne sont pas seulement impliqués dans l'altération des propriétés fonctionnelles de la MBG mais ils sont aussi responsables des modifications structurales de la MBG. Ceci a été démontré pour la première fois par Mc Verry et coll. qui observaient l'apparition de changements "pseudodiabétiques" lorsqu'ils injectaient de l'albumine glyquée dans les souris. Ils observaient entre autre l'expansion mésangiale, l'épaississement des MBG ainsi que l'apparition de la protéinurie (McVerry et coll., 1980). Il est connu que l'albumine glyquée stimule la synthèse du collagène de type IV, de fibronectine et de laminine ainsi que l'expression du TGF- β (Ziyadeh et coll., 1998; Cohen et coll., 1997; Ziyadeh et Cohen, 1993). En accord avec ces résultats, Cohen et coll. observent une réduction de l'épaississement de la MBG ainsi qu'une diminution de l'excrétion de l'albumine chez des animaux diabétiques lorsqu'ils injectent un anticorps spécifique contre l'albumine glyquée dans ces animaux (Cohen et coll., 1994; Cohen et coll., 1995). Ces données suggèrent que les produits d'Amadori sont impliqués dans le développement des lésions glomérulaires ainsi que dans la

perte de la fonction glomérulaire au cours du diabète. Le mécanisme par lequel l'albumine glyquée agit sur les cellules n'est pas encore parfaitement compris. Cependant, Cohen et ses collaborateurs ont démontré la présence de récepteurs spécifiques pour l'albumine glyquée au niveau des cellules mésangiales (Ziyadeh et coll., 1993; Cohen et coll., 1994; Wu et Cohen, 1995). Ces récepteurs pourraient donc avoir un rôle déterminant dans le développement de la glomérulopathie diabétique.

La glycation non-enzymatique de type "Amadori" s'effectue aussi au niveau des composants de la MBG, plus particulièrement sur le collagène de type IV (Cohen et coll., 1980; Perejda et Uitto, 1982; Schleicher et Weiland, 1984; Uitto et coll., 1982). Plusieurs évidences indiquent que la glycation s'effectue au niveau des groupes N-terminaux sur les résidus de lysine et d'hydroxylisine (Cohen et coll., 1981; Robins et Bailey, 1971). Il est maintenant évident que cette glycation altère la fonction et le métabolisme de la MBG. En effet, l'incubation de membranes basales glomérulaires isolées dans un milieu riche en glucose pendant une période de six semaines, modifie les propriétés sélectives de la perméabilité glomérulaire (Cochrane et coll., 1997). Ces chercheurs proposent que la glycation non-enzymatique formerait des liens croisés entre les protéines et ceci induirait l'expansion du réseau moléculaire de la MBG en modifiant ainsi les propriétés physico-chimiques et électro-chimiques de la MBG. D'autre part, l'accumulation de liens kétoamine dans la MBG augmente la demi-vie des protéines et diminue le renouvellement de ses constituants. Ainsi, nous n'écartons pas la possibilité que glycation non-enzymatique de type Amadori au niveau des constituants de la MBG

puisse être impliquée dans l'initiation de l'altération de la perméabilité glomérulaire dans des temps aussi courts que 10 jours d'hyperglycémie, cependant, personne n'a encore démontré la présence d'Amadori au niveau de la MBG dans des temps précoces du diabète. D'autre part, Daniels et son équipe ont démontré que la glycation des constituants de la MBG n'est pas nécessaire pour provoquer la perte de la fonction glomérulaire (Daniels et coll., 1992).

L'insuline est l'hormone anabolique responsable de la translocation du glucose par les cellules. De cette façon, l'insuline régule la concentration de glucose dans le sang. Outre l'action de l'insuline dans la régulation du glucose sanguin, cette hormone agit directement sur certaines cellules et est impliquée dans de nombreux phénomènes de transduction cellulaire. Il est bien connu que la normalisation de la glycémie prévient le développement des lésions glomérulaires au cours du diabète (Mauer et coll., 1974). Entre autre, l'administration d'insuline chez des rats diabétiques réduit la synthèse du collagène de type IV, l'épaississement de la MBG (Cohen et Khalifa, 1977) ainsi que le volume rénal (Rasch, 1980). De plus, en utilisant la technique de cryofixation et de cryofracture, Moriya et son équipe ont démontré que le diamètre des pores à l'intérieur de la MBG chez des animaux diabétiques pouvait être normalisé par un traitement à l'insuline (Moriya et coll., 1996). Par ailleurs, la normalisation de la glycémie effectuée dans des temps très avancés du diabète, ne semble pas atténuer les lésions glomérulaires (Pugliese et coll., 1997). Beaucoup d'études ont investigué l'effet de l'insuline et de la normalisation de la glycémie sur le développement des lésions morphologiques du glomérule, cependant très peu ont investigué l'effet de la normalisation de la

glycémie sur le rétablissement des propriétés sélective de la paroi glomérulaire dans des stades précoces du diabète.

Dans notre étude, nous avons donc voulu vérifier si la normalisation de la glycémie chez les animaux hyperglycémiques, pouvait être suffisante pour restaurer les propriétés sélectives de la paroi glomérulaire. Pour ce faire, des animaux hyperglycémiques depuis deux mois ont été quotidiennement traités à l'insuline pendant une durée d'un mois afin de maintenir une normoglycémie constante. La dose d'insuline a été ajustée individuellement pour chaque animal en fonction de leur glycémie. A l'aide d'analyses morphométriques, nous avons étudié et comparé la distribution de l'albumine sérique dans la MBG des animaux traités à l'insuline et des animaux hyperglycémiques depuis deux mois. Nous observons un rétablissement significatif de la distribution de l'albumine sérique à l'intérieur de la MBG des animaux traités à l'insuline. Ces résultats suggèrent donc que le traitement à l'insuline et la normalisation de la glycémie rétabli les propriétés filtrantes de la paroi glomérulaire. Étant donné que la formation des produits d'Amadori est directement proportionnelle au taux de glucose sanguin, nous assumons que le traitement à l'insuline qui réduit le taux de glucose sanguin, réduit aussi la concentration des produits d'Amadori (après une période de deux jours, Day et coll., 1980) et rétabli par le fait même, les propriétés fonctionnelles de la paroi glomérulaire. En conclusion nous proposons que l'albumine glyquée circulante présente après dix jours d'hyperglycémie, contribue à l'initiation de l'altération de la perméabilité glomérulaire dans des stades précoces du diabète et éventuellement au développement de la glomérulopathie diabétique.

Conclusion

Dans cette étude, nous avons utilisé la technique d'immunocytochimie à l'or colloïdal combinée à des analyses morphométriques afin d'étudier la distribution de l'albumine à l'intérieur de la MBG. Nous avons démontré que la perméabilité glomérulaire est altérée dans des temps très précoces du diabète. Cette altération fonctionnelle se traduit par le passage de l'albumine au travers la paroi glomérulaire.

Pour le moment, il est difficile de désigner le ou les facteurs responsables de la perte de la fonction glomérulaire dans des temps aussi précoces du diabète. Toutefois dans cette étude, nous avons démontré que l'altération précoce de la perméabilité glomérulaire n'est pas concomitante aux modifications structurales. En effet, l'épaississement de la MBG ainsi que la modification de la distribution du collagène de type IV ont été observés bien après l'apparition de la perte de la perméabilité glomérulaire. Cependant, nos résultats suggèrent que ces modifications structurales contribuent au développement des altérations fonctionnelles et structurales du glomérule dans des étapes plus avancées du diabète.

La modification de certains facteurs hémodynamiques ainsi que l'altération des charges intrinsèques de la paroi glomérulaire sont aussi des facteurs qui contribuent au développement de la glomérulopathie diabétique, cependant il semble que ces facteurs ne sont pas suffisants pour expliquer le passage de

l'albumine sérique au travers de la MBG dans des temps très courts suivant l'induction du diabète.

Il est connu que seule la présence de l'albumine glyquée dans le sang est suffisante pour induire une altération de la perméabilité glomérulaire. En présence de glucose, la formation de l'albumine glyquée est très rapide. De plus, la quantité d'albumine glyquée dans le sang est directement proportionnelle aux taux de glucose sanguin. Nous assumons donc que suite à l'induction du diabète, les quantités d'albumine glyquée circulante augmentent très rapidement et que ces dernières contribuent à la perte de la perméabilité glomérulaire dans les stades précoces du diabète. Le mécanisme par lequel l'albumine glyquée altère la perméabilité glomérulaire n'est pas encore connu. Dans cette étude, nous avons finalement démontré que la normalisation de la glycémie par un traitement à l'insuline, rétablissait les propriétés sélectives de la paroi glomérulaire. Nous assumons que la réduction des taux de glucose sanguin réduit aussi la concentration d'albumine glyquée et rétablit par le fait même les propriétés de filtration glomérulaire. Dans ce cas, l'effet de l'albumine glyquée sur la perméabilité glomérulaire ne serait que temporaire.

Dans un travail futur, il serait très intéressant d'évaluer quantitativement les taux d'albumine glyquée circulante dans des stades précoces du diabète ainsi qu'après un traitement à l'insuline afin de vérifier s'il y a réellement une relation entre la perte de la perméabilité glomérulaire, la glycémie et la présence d'albumine glyquée dans

le sang. Pour ce faire, nous pourrions utiliser des méthodes de chromatographie d'affinité ou bien d'ELISA avec un anticorps spécifique contre l'albumine glyquée. Toutes ces méthodes de quantification ont déjà été utilisées pour évaluer les quantités d'albumine glyquée dans le sang. Il serait aussi intéressant de quantifier biochimiquement les quantités d'albumine glyquée tissulaire (MBG) dans des stades précoces du diabète.

Depuis deux ans, il existe sur le marché un anticorps spécifique contre l'albumine glyquée de type Amadori. Il serait donc intéressant d'injecter cet anticorps chez des animaux dans des stades précoces du diabète afin de vérifier s'il se produit un rétablissement des propriétés sélectives de la paroi glomérulaire. Ce modèle nous permettrait d'étudier directement le rôle des produits d'Amadori dans le développement de la glomérulopathie diabétique. La perméabilité glomérulaire est régulée par une multitude de facteurs. Il est possible que l'altération de la perméabilité glomérulaire dans des étapes précoces du diabète, puisse être le résultat de plusieurs facteurs. Cependant, l'hyperglycémie et plus précisément l'albumine glyquée semblent être des facteurs prédominants.

Bibliographie

- Abrahamson DR** (1985) Origin of the glomerular basement membrane visualized after in vivo labeling of laminin in newborn rat kidneys. *J Cell Biol* **100**, 1988-2000.
- Alpers CE, Hudkins KL, Gown AM, Johnson RJ** (1992) Enhanced expression of 'muscle-specific' actin in glomerulonephritis. *Kidney Int* **41**, 1134-1142.
- Arakawa M** (1971) A scanning electron microscopy of the human glomerulus. *Am J Pathol* **64**, 457-466.
- Arendshorst WJ, Gottschalk CW** (1985) Glomerular ultrafiltration dynamics: Historical perspective. *Am J Physiol* **248**, F163-F174.
- Arturson G, Groth T, Grotte G** (1971) Human glomerular membrane porosity and filtration pressure: Dextran clearance data analyzed by theoretical models. *Clin Sci* **40**, 137-158.
- Ausiello DA, Kreisberg JL, Roy C, Karnovsky MJ** (1980) Contraction of cultured rat glomerular cells of apparent mesangial origin after stimulation with angiotensin II and arginine vasopressin. *J Clin Invest* **65**, 754-760.
- Ayo SH, Radnik RA, Glass IJ, Garoni JA, Rampt ER, Appling DR, Kreisberg JI** (1990) Increased extracellular matrix synthesis and mRNA in mesangial cells grown in high-glucose medium. *Am J Physiol* **260**, F185-F191.
- Bakala H, Geloso-Meyer A, Cheignon M, Schaefferbeke J** (1985) Differentiation of the glomerular filtration barrier in the rat fetus: Possible role of collagen. *Connect Tissue Res* **13**, 283-290.
- Ballermann BJ, Skorecki KL, Brenner BM** (1984) Reduced glomerular angiotensin II receptor density in early untreated diabetes mellitus in the rat. *Am J Physiol* **247**, F110-F116.

- Batsford SR, Rourbach R, Vogt A** (1987) Size restriction in the glomerular capillary wall: Importance of lamina densa. *Kidney Int* **31**, 710-717.
- Battaglia C, Mayer U, Aumailley M, Timpl R** (1992) Basement-membrane heparan sulfate proteoglycan binds to laminin by its heparan sulfate chains and to nidogen by sites in the protein core. *Eur J Biochem* **208**, 359-366.
- Baynes JW, Monnier VM** (1989) The maillard reaction in aging diabetes and nutrition. *Prog Clin Biol Res* **304**, 1-10.
- Beck K, Hunter I, Engel J** (1990) Structure and function of laminin: Anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J* **4**, 148-160.
- Beisswenger PJ, Spiro RG** (1970) Human glomerular basement membrane: Chemical alteration in diabetes mellitus. *Science* **168**, 596-598.
- Beisswenger PJ, Spiro RG** (1973) Studies in the human glomerular basement membrane: Composition, nature of the carbohydrate units and chemical changes in diabetes mellitus. *Diabetes* **22**, 180-193.
- Beisswenger PJ** (1976) Glomerular basement membrane. Biosynthesis and chemical composition in the streptozotocin diabetic rat. *J Clin Invest* **58**, 844-852.
- Bendayan M** (1980) Use of the protein A-gold technique for the morphological study of vascular permeability. *J Histochem Cytochem* **28**, 1251-1254.
- Bendayan M** (1985) Alteration in the distribution of type IV collagen in glomerular basal lamina in diabetic rats as revealed by immunocytochemistry and morphometrical approach. *Diabetologia* **28**, 373-378.
- Bendayan M, Gingras D, Charest P** (1986) Distribution of endogenous albumin in the glomerular wall of streptozotocin-induced diabetic rats as revealed by high-resolution immunocytochemistry. *Diabetologia* **29**, 868-875.

Bendayan M, Benhamou N, Desjardins M (1990) Ultrastructural distribution of lectin-binding sites in the glomerular wall of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Submicrosc Cytol Pathol* **22**,173-184.

Bendayan M, Londoño I (1996) Reabsorption of native and glycated albumin by renal proximal tubular epithelial cells. *Am J Physiol* **271**, F261-F268.

Bendayan M, Rasio EA (1996) Transport of insulin and albumin by the microvascular endothelium of rete mirabile. *J Cell Sci* **109**, 1857-1864.

Bendayan M (1998) Immunocytochemical detection of advanced glycated end products in rat renal tissue as a function of age and diabetes. *Kidney Int* **54**, 438-447.

Bennett PH (1983) The diagnosis of diabetes: New internal classification and diagnostic criteria. *Ann Rev Med* **34**, 295-309.

Bertolatus JA, Klinzman D (1991) Macromolecular sieving by glomerular basement membrane *in vitro*: Effect of polycation or biochemical modifications. *Microvascular Research* **41**, 311-327.

Bjørn SF, Bangstad HJ, Hanssen KF, Nyberg G, Walker JD, Viberti GC, Østerby R (1995) Glomerular epithelial foot processes and filtration slits in IDDM patients. *Diabetologia* **38**,1197-1204.

Blau EB, Haas DE (1973) Glomerular sialic acid and proteinuria in human renal disease. *Lab Invest* **28**, 477-481.

Bohrer MP, Baylis C, Humes HD, Glasscock RJ, Robertson C, Brenner BM (1978) Permeability of the glomerular capillary wall facilitated filtration of circulating polycations. *J Clin Invest* **61**, 72-78.

Bohrer MP, Deen WM, Robertson CR, Troy JL, Brenner BM (1979) Influence of molecular configuration on the passage of macromolecules across the glomerular capillary wall. *J Gen Physiol* **74**, 583-593.

Border WA, Okuda S, Languino LR, Sporn MB, Ruoslahti E (1990) Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor β_1 . *Nature* **346**, 371-374.

Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi Y, Pierschbacher MD, Rouslahti E (1992) Natural inhibitor of transforming growth factor- β protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature Lond* **360**, 361-364.

Born van den J, Heuvel van den LPWJ, Bakker MAH, Veerkamp JH, Assmann KJM, Berden JHM (1992) A monoclonal antibody against GBM heparan sulfate induces an acute selective proteinuria in rats. *Kidney Int* **41**, 115-123.

Born van den J, van Kraats AA, Bakker MAH, Assmann KJM, van den Heuvel LPWJ, Veerkamp JH, Berden JHM (1995a) Selective proteinuria in diabetic nephropathy in the rat is associated with a relative decrease in glomerular basement membrane heparan sulphate. *Diabetologia* **38**, 161-172.

Born van den J, van Kraats AA, Bakker MAH, Assmann KJM, Dijkman HBPM, van der Laak JAWM, Berden JHM (1995b) Reduction of heparan sulfate-associated anionic sites in the glomerular basement membrane of rats with streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Diabetologia* **38**, 1169-1175.

Bowman W (1842) On the structure and use of the Malpighian bodies of the kidney, with observation on the circulation through the gland. *Biol Sci* **132**, 57-80.

Boyd CD, Toth-Fejel S, Gadi IK, Litt M, Condon MR, Kolbe M, Hagen IK, Kurkinen M, Mackenzie JW, Magenis E (1988) The genes coding for human pro α_1 (IV) and pro α_2 (IV) collagen are both located at the end of the long arm of chromosome 13. *Am J Hum Genet* **42**, 309-314.

Boyd-White J, Williams Jr. JC (1996) Effect of cross-linking on matrix permeability. A model for AGE-Modified basement membranes. *Diabetes* **45**, 348-353.

Braus H (1924) Anatomie des Menschen. *Springer-Verlag*, Berlin.

Brenner BM, Troy JL, Daugharty TM (1971) The dynamics of glomerular ultrafiltration in the rat. *J Clin Invest* **50**, 1776-1780.

Brenner BM, Bohrer MP, Baylis C, Deen WM (1977) Determinants of glomerular permselectivity: Insights derived from observations *in vivo*. *Kidney Int* **12**, 229-237.

Brenner BM, Hostetter TH, Humes HD (1978) Glomerular permselectivity: Barrier function based on discrimination of molecular size and charge. *Am J Physiol* **234**, F455-F460.

Brenner BM, Ichikawa I, Deen WM (1981) Glomerular filtration. Dans: *The Kidney, 2nd edition*. Brenner BM et Rector FC (eds). Saunders WB, Philadelphia, pp. 289-327.

Brenner BM, Dworkin LD, Ichikawa I (1986) Glomerular filtration. Dans: *The Kidney, 3rd edition*. Brenner BM et Rector FC (eds). Saunders WB, Philadelphia, pp. 124-144.

Brochtner-Mortensen J (1973) The glomerular filtration rate during moderate hyperglycemia in normal man. *Acta Med Scand* **194**, 31-37.

Brownlee M, Vlassara H, Cerami A (1983) Nonenzymatic glycosylation reduces the susceptibility of fibrin to degradation by plasmin. *Diabetes* **32**, 680-684.

Brownlee M, Cerami A, Vlassara H (1988) Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* **318**, 1315-1321.

Bulger RE, Eknayan G, Purcell DJ II, Dobyan DC (1983) Endothelial characteristics of glomerular capillaries in normal, mercuric chloride induced, and gentamicin-induced acute renal failure in the rat. *J Clin Invest* **72**, 128-141.

Bundschuh I, Jäckle-Meyer I, Lüneberg E, Bentzel C, Petzoldt R, Stolte H (1992) Glycation of serum albumin and its role in renal protein excretion and the development of diabetic nephropathy. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* **30**, 651-656.

Bunn HF, Gabbay KH, Gallop PM (1978) The glycosylation of hemoglobin: Relevance to diabetes mellitus. *Science* **200**, 21-27.

Bunn HF, Higgins PJ (1981) Reaction of monosaccharides with proteins: Possible evolutionary significance. *Science* **213**, 222-224.

Butkowski RJ, Wieslander J, Kleppel M, Michael AF, Fish AJ (1989) Basement membrane collagen in the kidney: Regional localization of novel chains related to collagen IV. *Kidney Int* **35**, 1195-1202.

Carlin B, Jaffe R, Bender B, Chung AE (1981) Entactin, a novel basal lamina associated sulfated glycoprotein. *J Biol Chem* **256**, 5209-5214.

Carter WG, Ryan MC, Gahr PJ (1991) Epiligrin, a new cell adhesion ligand for integrin $\alpha_3 \beta_1$ in epithelial basement membrane. *Cell* **65**, 599-610.

Caufield JP, Farquhar MG (1974) The permeability of glomerular capillaries to graded dextrans. Identification of the basement membrane of capillaries as the primary filtration barrier. *J Cell Biol* **63**, 883-903.

Caufield JP, Farquhar MG (1976) Distribution of anionic sites in glomerular basement membranes. Their possible role in filtration and attachment. *Proc Natl Acad Sci USA* **73**, 1646-1650.

Chan FL, Inoue S, Leblond CP (1993) The basement membranes of cryofixed or aldehyde-fixed, freeze-substituted tissues are composed of a lamina densa and do not contain a lamina lucida. *Cell Tissue Res* **273**, 41-52.

Chan FL, Inoue S (1994) Lamina lucida of basement membrane: An artefact. *Microsc Res Tech* **28**, 48-59.

Chang RLS, Robertson CR, Deen WM, Brenner BM (1975a) Permselectivity of the glomerular capillary wall to macromolecules. I. Theoretical considerations. *Biophys J* **15**, 861-886.

Chang RLS, Ueki IF, Troy JL, Deen WM, Robertson CR, Brenner BM (1975b) Permselectivity of the glomerular capillary wall to macromolecules. II. Experimental studies in rats using neutral dextran. *Biophys J* **15**, 887-906.

Chang RLS, Deen WM, Robertson CR, Brenner BM (1975c) Permselectivity of the glomerular capillary wall. III. Restricted transport of polyanions. *Kidney Int* **8**, 212-218.

Christiansen J, Gammelgaard J, Orskov H, Andersen AR, Telmer S, Parving HH (1981a) Kidney function and size in normal subjects before and during growth hormone administration for one week. *European J Clin Invest* **11**, 487-490.

Christiansen J, Gammelgaard J, Frandsen M, Parving HH (1981b) Increased kidney size, glomerular filtration rate and renal plasma flow in short-term insulin-dependent diabetics. *Diabetologia* **20**, 451.

Christlieb AR (1974) Renin, antiotensin, and norepinephrine in alloxan diabetes. *Diabetes* **23**, 962-970.

Chung AE, Durkin ME (1990) Entactin: Structure and function. *Am J Res Cell Mol Biol* **3**, 275-282.

Cochrane SM, Byrne JC, Robinson GB (1997) The permselectivity of glomerular basement membrane can be compromised by glycation or by exposure to low levels of hypochlorite. *Biochim Biophys Acta* **1361**, 217-228.

Cohen MP, Khalifa A (1977) Renal glomerular collagen synthesis in streptozotocin diabetes. Reversal of increased basement membrane synthesis with insulin therapy. *Biochim Biophys Acta* **500**, 395-404.

Cohen AH, Mampaso F, Zamboni L (1977) Glomerular podocyte degeneration in human renal disease. An ultrastructural study. *Lab Invest* **37**, 30-42.

Cohen MP, Urdanivia E, Surma ML, Wu VY (1980) Increased glycosylation of glomerular basement membrane collagen in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* **95**, 765-769.

Cohen MP, Surma ML (1981) Sulfate incorporation into glomerular basement membrane is decreased in experimental diabetes. *J Lab Clin Med* **78**, 715-722.

Cohen MP, Urdanivia E, Surma ML, Ciborowski CJ (1981) Nonenzymatic glycosylation of basement membranes in vitro studies. *Diabetes* **30**, 367-371.

Cohen MP, Surma ML, Wu VY (1982) In vivo biosynthesis and turnover of glomerular basement membrane in diabetes. *Am J Physiol* **242**, F385-F389.

Cohen MP (1986) Diabetes and protein glycosylation: Measurement and Biologic Relevance. New York, Springer Verlag.

Cohen MP, Hud E (1989) Measurement of plasma glycoalbumin levels with a monoclonal antibody-based ELISA. *J Immunol Methods* **122**, 279-283.

Cohen MP, Ziyadeh FN (1994) Role of Amadori-modified nonenzymatically glycosylated serum proteins in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Am Soc Nephrol* **7**, 183-190.

Cohen MP, Hud E, Wu VY (1994) Amelioration of diabetic nephropathy with monoclonal antibodies against glycated albumin. *Kidney Int* **45**, 1673-1679.

Cohen MP, Sharma K, Jin Y (1995) Prevention of diabetic nephropathy in db/db mice with glycated albumin antagonists: A novel treatment strategy. *J Clin Invest* **95**, 2338-2345.

Cohen MP, Wu VY, Cohen JA (1997) Glycated albumin stimulates fibronectin and collagen IV. Production by glomerular endothelial cells under normoglycemic conditions. *Biochem Biophys Res Commun* **239**, 91-94.

Comper WD, Laurent TC (1978) Physiological function of connective tissue polysaccharides. *Physiol Rev* **58**, 255-315.

Cooper ME, Allen TJ, Jerums G, Doyle AE (1987) Genetic hypertension accelerates nephropathy in the streptozotocin diabetic rat. *Proc Am Soc Hyperten* (Abstract), 111.

Cotran RS, Karnovsky MJ (1967) Vascular leakage induced by horseradish peroxidase in rat. *Proc Soc Exp Biol Med* **126**, 557-561.

Courtoy PJ, Kanwar YS, Hynes RO, Farquhar MG (1980) Fibronectin localization in the rat glomerulus. *J Cell Biol* **87**, 691-696.

Courtoy PJ, Picton DH, Farquhar MG (1983) Resolution and limitations of the immunoperoxidase procedure in the localization of extracellular matrix antigens. *J Histochem Cytochem* **31**, 945-951.

Couser WG, Adler S, Baker PJ (1984) Mechanisms of immune complex formation and deposition in glomeruli: An overview. Dans: *Proc Int Congr Nephrol* New York. NY, Springer Verlag, pp. 508-527.

Craven PA, De Rubertis FR (1989) Protein kinase C is activated in glomeruli from streptozotocin diabetic rats. Possible mediation by glucose. *J Clin Invest* **83**, 1667-1675.

Cruz A, Moreau-Lalande H (1978) Biochemical studies on glomerular basement membrane in human diabetic microangiopathy. *Pathol Biol* **26**, 411-417.

Dachs S, Churg J, Mautner W, Grishman E (1964) Diabetic nephropathy. *Am J Pathol* **44**, 155.

Daniels BS, Hostetter TH (1990) Glomerular basement membrane is not the predominant site of charge permselectivity in the glomerulus. *J Am Soc Nephrol* **1**, 626-634.

Daniels BS, Hausser EB (1992) Glycation of albumin, not glomerular basement membrane, alter permeability in an in vitro model. *Diabetes* **41**, 1415-1421.

Daniels BS (1993) The role of the glomerular epithelial cell in the maintenance of the glomerular filtration barrier. *Am J Nephrol* **13**, 318-323.

Daniels BS, Deen WM, Mayer G, Meyer T, Hostetter TH (1993) Glomerular permeability barrier in the rat. Functional assessment by in vitro methods. *J Clin Invest* **92**, 929-936.

Danne T, Spiro MJ, Spiro RG (1993) Effect of high glucose on type IV collagen production by cultured glomerular epithelial, endothelial and mesangial cells. *Diabetes* **42**, 170-177.

Day JF, Thorpe JR, Baynes JM (1979) Nonenzymatically glucosylated albumin: In vitro preparation and isolation from normal human serum. *J Biol Chem* **254**, 595-597.

Days JF, Ingelbretsen CG, Ingelbretsen WR, Baynes J, Thorpe SR (1980) Nonenzymatic glycosylation of serum proteins and hemoglobin: Response to changes in blood glucose levels in diabetic rats. *Diabetes* **29**, 524-527.

Deckert T, Feldt-Rasmussen B, Djurup R, Deckert M (1988) Glomerular size and charge selectivity in insulin-dependent diabetes mellitus. *Kidney Int* **33**, 100-106.

Dedhar S, Jewell K, Rojiani M, Gray V (1992) The receptor for the basement membrane glycoprotein entactin is the integrin $\alpha_3\beta_1$. *J Biol Chem* **267**, 18908-18914.
Deen WM, Robertson CR, Brenner BM (1974) Glomerular ultrafiltration. *Fed Proc* **33**, 14-20.

Deen WM, Bridges CR, Brenner BM, Myers BD (1985) Heteroporous model of glomerular size selectivity: Application to normal and nephrotic humans. *Am J Physiol* **249**, F374-F389.

Deisenhofer J (1981) Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution. *Biochemistry* **20**, 2361-2369.

del Castillo E, Fuenzalida and R, Uranga J (1977) Increased glomerular filtration rate and glomerulopressin activity in diabetic dogs. *Horm Metab Res* **2**, 46-53.

Desjardins M, Bendayan M (1989) Ultrastructural distribution of endogenous IgGs in the glomerular wall of control and diabetic rats. *Histochemical J* **21**, 731-742.

Desjardins M, Bendayan M (1990) Ultrastructural distribution of glomerular basement membrane components in experimental diabetes. *Diabetes Research* **14**, 65-73.

Desjardins M, Gros F, Wieslander J, Gubler MC, Bendayan M (1990) Heterogenous distribution of monomeric elements from the globular domain (NC1) of type IV collagen in renal basement membranes as revealed by high resolution quantitative immunocytochemistry. *Lab Invest* **63**, 637-646.

Desjardins M, Bendayan M (1991) Ontogenesis of glomerular basement membrane: Structural and functional properties. *J Cell Biol* **113**, 689-700.

Det van NF, van den Born J, Tamsma JT, Verhagen NAM, Berden JHM, Bruijn JA, Daha MR, van der Woude FJ (1996) Effects of high glucose on the production of heparan sulfate proteoglycan by mesangial and epithelial cells. *Kidney Int* **49**, 1079-1089.

Ditzel J, Junker K (1973) Abnormal glomerular filtration rate, renal plasma flow and renal protein excretion in recent and short-term diabetes. *Br Med J* **II**, 13-19.

Doi T, Vlassara H, Kirstein M, Yamada Y, Striker GE, Striker LJ (1992) Receptor-specific increase in extracellular matrix production in mouse mesangial cells by advanced glycosylation end products in mediated via platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 2873-2877.

Doria A, Warram JH, Krolewski AS (1992) Insulin receptor gene polymorphism is associated with the development of overt proteinuria. *J Am Soc Nephrol* **3**, 756-761.

Doucet M, Londoño I, Gómez-Pascual A, Bendayan M (2000) Glomerular basement membrane selective permeability in short-term streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Exp Diab*. Sous presse.

Drenckhahn D, Schnittler H, Nobiling R, Kriz W (1990) Ultrastructural organization of contractile proteins in rat glomerular mesangial cells. *Am J Pathol* **137**, 1343-1351.

Duncan KG, Fessler LI, Bachinger HP, Fessler JH (1983) Procollagen IV. Association to tetramers. *J Biol Chem* **258**, 5869-5877.

Dworkin LD, Brenner BM (1992) Biophysical basis of glomerular filtration. Dans: *The Kidney: Physiology and pathophysiology, Second Edition*. Seldin DW et Giebisch G (eds). Raven Press, Ltd., New York, pp. 979-1016.

Dyck RF, Lockwood CM, Kershaw M, McHugh N, Duance VC, Baltz ML, Pepys MB (1980) Amyloid P component is a constituent of normal human glomerular basement membrane. *J Exp Med* **152**, 1162-1174.

Eisenbach GM, Van Liew JB, Manz N, Muir P (1975) Effect of angiotensin on the filtration of protein in the rat kidney: A micropuncture study. *Kidney Int* **8**, 80-87.

Ekblom P (1993) Basement membranes in development: Dans *Molecular and Cellular Aspects of Basement Membranes*. Rohrbach DH et Timpl R (eds). San Diego, Academic Press, pp. 359-383.

Elema JD, Hoyer JR, Vernier RL (1976) The glomerular mesangium: Uptake and transport of intravenously injected colloidal carbon in rats. *Kidney Int* **9**, 395-406.

Emanuel BS, Sellinger BT, Gudas LJ, Myers JC (1986) Localization of the human procollagen $\alpha 1$ (IV) gene to chromosome 13q34 by in situ hybridization. *Am J Hum Genet* **38**, 38-44.

Engel J (1992) Laminins and other strange proteins. *Biochemistry* **31**, 10643-10651.

Engel J (1993) Structure and function of laminin. Dans: *Molecular and Cellular Aspects of Basement Membranes*. Rohrbach DH et Timpl R (eds). San Diego. Academic Press, pp. 147-176.

Farquhar MG, Hopper J, Moon HD (1959) Diabetic glomerulosclerosis; electron and light microscopic studies. *Am J Pathol* **35**, 721-753.

Farquhar MG, Wissig SL, Palade GE (1961) Glomerular permeability. I. Ferritin transfer across the normal glomerular capillary wall. *J Exp Med* **113**, 47-66.

Farquhar MG, Palade GE (1962) Functional evidence for the existence of a third cell type in the renal glomerulus. *J Cell Biol* **13**, 55-87.

Farquhar MG (1981) The glomerular basement membrane: A selective macromolecular filter. Dans: *Cell Biology of Extracellular Matrix*. Hay ED (ed). Plenum Publishing Corp., New York, pp. 335-378.

Fioretto P, Steffes MW, Sutherland DER, Goetz FC, Mauer M (1997) Successful pancreas transplantation (PT) alone reverses established lesions of diabetic nephropathy (DN) in man. *J Am Soc Nephrol* **8** (abstract), 111A.

Forsgren A, Sjöquist J (1966) "Protein A" from *S. Aureus*: Pseudoimmune reaction with human γ -globulins. *J Immunol* **97**, 822-827.

Forster RP, Maes JP (1947) Effect of experimental neurogenic hypertension on renal blood flow and glomerular filtration rates in intact denervated kidneys of unanesthetized rabbits with adrenal glands demedullated. *Am J Physiol* **150**, 534-540.

Fox JW, Mayer U, Nischt R, Aumailley M, Reinhardt D, Wiedemann H, Mann K, Timpl R, Krieg T, Engel J, Chu M-L (1991) Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen IV. *EMBO J* **10**, 3137-3146.

Fujigaki Y, Nagase M, Hidaka S, Matsui K, Shirai M, Nosaka H, Kawachi H, Shimizu F, Hishida A (1998) Altered anionic GBM components in monoclonal antibody against slit diaphragm-injected proteinuric rats. *Kidney Int* **54**, 1491-1500.

Fukui M, Nakamura T, Ebihara I, Shirato I, Tomino Y, Koide H (1992) ECM gene expression and its modulation by insulin in diabetic rats. *Diabetes* **41**, 1520-1547.

Gabbay KH, Kinoshita JH (1972) Mechanisms of development and prevention of cataracts. *Isr J Med Sci* **8**, 1557-1561.

Garcia VM, Girardi G, Ochoa JE, Torres AM, Elias MM (1998) Early manifestations of nephropathy in alloxan-treated rats. *Ren Fail* **20**, 551-564.

Garlick RL, Bunn FH, Spiro RG (1988) Nonenzymatic glycation of basement membranes from human glomeruli and bovine sources. *Diabetes* **37**, 1144-1150.

Gassee MP (1973) Effect of acetylcholine on glomerular sieving of macromolecules. *Pflügers Arch* **342**, 239-254.

Gehlsen KR, Dillner L, Engvall E, Ruoslahti E (1988) The human laminin receptor is a member of the integrin family of cell adhesion receptors. *Science* **241**, 1228-1229.

Gehlsen KR, Dickerson K, Argraves WS, Engvall E, Ruoslahti E (1989) Subunit structure of a laminin-binding integrin and localization of its binding site on laminin. *J Biol Chem* **264**, 19034-19038.

Gerl M, Mann K, Aumailey M, Timpl R (1991) Localization of a major nidogen-binding site to domain III of laminin B2 chain. *Eur J Biochem* **202**, 167-174.

Ghiggeri GM, Candiano G, Delfino G, Bianchini F, Queriole C (1984) Glycosyl albumin and diabetic microalbuminuria: Demonstration of an altered renal handling. *Kidney Int* **25**, 565-570.

Ghitescu L, Bendayan M (1992) Transendothelial transport of serum albumin: A quantitative immunocytochemical study. *J Cell Biol* **117**, 745-755.

Ghitescu L, Desjardins M, Bendayan M (1992) Immunocytochemical study of glomerular permeability to anionic, neutral and cationic albumins. *Kidney Int* **42**, 25-32.

Goldblatt H (1938) Experimental hypertension induced by renal ischemia. *Harvey Lect* **33**, 237.

Glanville RW, Qian RQ, Siebold B, Risteli J, Kuhn K (1985) Amino acid sequence of the N-terminal aggregation and cross-linking region (7S domain) of the $\alpha 1$ (IV) chain of human basement membrane collagen. *Eur J Biochem* **152**, 213-219.

Goudswaard J, Van der Donk JA, Noordzij A, Van Dam RH, Vaerman JP (1978) Protein A reactivity of various mammalian immunoglobulins. *Scand J Immunol* **8**, 21-28.

Goode NP, Shires M, Crellin DM, Aparicio SR, Davison AM (1995) Alterations of glomerular basement membrane charge and structure in diabetic nephropathy. *Diabetologia* **38**, 1455-1465.

Graham RC, Karnovsky MJ (1966) Glomerular permeability: Ultrastructural cytochemical studies using peroxidase as protein tracers. *J Exp Med* **124**, 1123-1134.

Graham RC, Kellermeyer RW (1968) Bovine lactoperoxidase as a cytochemical protein tracer for electron microscopy. *J Histochem Cytochem* **16**, 275-278.

Grant D S, Leblond C P (1988) Immunogold quantitation of laminin, type IV collagen, and heparan sulfate proteoglycan in a variety of basement membranes. *Histochemical J*, **36**, 271-283.

Greene D (1988) The pathogenesis and its prevention of diabetic neuropathy and nephropathy. *Metabolism* **37**(suppl), 25-29.

Groggel GC, Stevenson J, Hovingh P, Linker A, Border WA (1988) Changes in heparan sulfate correlate with increased glomerular permeability. *Kidney Int* **33**, 517-523.

Guthrow CE, Morris MA, Day JF, Thorpe SR, Baynes JW (1979) Enhanced nonenzymatic glycosylation of human serum albumin in diabetic mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 4248-4261.

Hanks SK, Calalb MB, Harper MC, Patel SK (1992) Focal adhesion protein tyrosine kinase phosphorylated in response to cell spreading on fibronectin. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 8487-8491.

Hanks SK, Polte TR (1997) Signaling through focal adhesion kinase. *BioEssays* **19**,137-145.

Hardwicke J, Squire JR (1955) The relationship between plasma albumin concentration and protein excretion in patients with proteinuria. *Clin Sci* **14**, 509-530.

Hardwicke J, Cameron JS, Harrison JF, Hulme B, Soothill JF (1970) Proteinuria studied by clearances of individual macromolecules. Dans: *Proteins in Normal and Pathological Urine*. Manuel Y, Revillard JP et Betuel H (eds). University Park Press, Baltimore, pp. 111-152.

Hartroft PM, Edelman R (1960) Renal juxtaglomerular cells in sodium deficiency. Dans *Edema*. Moyer JH et Fuchs M (eds.). Philadelphia, W.B. Saunders, pp. 63-68.

Hartroft PM, Bischoff MB, Boucci TJ (1969) Effects of chronic exposure to high altitudes on the JG complex and the adrenal cortex in dogs, rabbits and rats. *Fed Proc* **28**, 1234-1237.

Hasslacher C, Ritz E, Terpstra J, Gallasch G, Kunowski G, Rall C (1985) Natural history of nephropathy in type I diabetes. Relationship to metabolic control and blood pressure. *Hypertension* **7** (suppl II), II-74-II-78.

Herf S, Pohl SL, Sturgill B, Bolton WK (1979) An evaluation of diabetic and pseudodiabetic glomerulosclerosis. *Am J Med* **66**, 1040-1045.

Higgins PJ, Bunn HF (1981) Kinetic analysis of nonenzymatic glycosylation of hemoglobin. *J Biol Chem* **256**, 5204-5208.

Hirose K, Tsuchida H, Østerby R, Gundersen HJG (1980) A strong correlation between glomerular filtration rate and filtration surface in diabetic kidney hyperfunction. *Lab Invest* **43**, 434-437.

- Hirose K, Østerby R, Nozawa M, Gundersen HJG** (1982) Development of glomerular lesions in experimental long-term diabetes in the rat. *Kidney Int* **21**, 689-695.
- Hostetter TH, Troy JL, Brenner BM** (1981) Glomerular hemodynamics in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int* **19**, 410-415.
- Hostetter TH, Rennke HG, Brenner BM** (1982) The case for intrarenal hypertension in the initiation and progression of diabetic and other glomerulopathies. *Am J Med* **72**, 375-380.
- Hostetter TH** (1986) Diabetic nephropathy. Dans *The Kidney*. Brenner BM and Rector FC (eds). Philadelphia, Ardmore Medical Books, pp. 1377.
- Hostikka SL, Eddy RL, Byers MG, Hoyhtya M, Shows TB, Tryggvason K** (1990) Identification of a distinct type IV collagen α chain with restricted kidney distribution and assignment of its gene to the locus of X chromosome-linked Alport syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 1606-1610.
- Houser MT, Scheinman JI, Basgen J, Steffes MW, Michael AF** (1982) Preservation of mesangium and immunohistochemically defined antigen in glomerular basement membrane isolated by detergent extraction. *J Clin Invest* **69**, 1169-1175.
- Huang TW, Langlois JC** (1985) Podoendin: A new cell surface protein of podocyte and epithelium. *J Exp Med* **162**, 245-267.
- Ichiyasu A, Makino H** (1988) Molecular sieve of the rat glomerular basement membrane: A transmission electron microscopy study of enzyme treated specimens. *Acta Med Okayana* **42**, 317-325.
- Inoue S, Bendayan M** (1995) High-resolution ultrastructural study of the rat glomerular basement membrane in long-term experimental diabetes. *Ultrastruct Pathol* **19**, 175-185.

Jensen PK, Christiansen JS, Stevens K, Parving HH (1987) Strict metabolic control and renal function in the streptozotocin diabetic rat. *Kidney Int* **31**, 47-51.

Jørgensen F, Bentzon MW (1968) The ultrastructure of the normal human glomerulus. Thickness of the glomerular basement membrane. *Lab Invest* **18**, 42-48.

Kamagata Y, Mattei MG, Ninomiya Y (1992) Isolation and sequencing of cDNAs and genomic DNAs encoding the $\alpha 4$ chain of basement membrane collagen type IV and assignment of the gene to the distal long arm of human chromosome 2. *J Biol Chem* **267**, 23753-23758.

Kanwar YS, Farquhar MG (1979a) Anionic sites in the glomerular basement membrane. In vivo and in vitro localization to the laminae rarae by cationic probes. *J Cell Biol* **81**, 137-153.

Kanwar YS, Farquhar MG (1979b) Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 1302-1307.

Kanwar YS, Farquhar MG (1979c) Isolation of glycosaminoglycans (heparan sulfate) from glomerular basement membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 4493-4497.

Kanwar YS, Farquhar MG (1980) Detachment of endothelium and epithelium from the glomerular basement membrane produced by kidney perfusion with neuraminidase. *Lab Invest* **42**, 375-384.

Kanwar YS, Linker A, Farquhar MG (1980) Increased permeability of the glomerular basement membrane to ferritin after removal of glycosaminoglycans (heparan sulfate) by enzyme digestion. *J Cell Biol* **86**, 688-693.

Kanwar YS, Rosenzweig LJ (1982) Altered glomerular permeability as a result of focal detachment of the visceral epithelium. *Kidney Int* **21**, 565-574.

Kanwar YS, Rosenzweig LJ, Linker A, Jakubowski ML (1983) Decreased de novo synthesis of glomerular proteoglycans in diabetes: Biochemical and autoradiographic evidence. *Proc Natl Acad Sci* **80**, 2272-2275.

Karnovsky MJ (1979) The structural basis for glomerular filtration. Dans: *Kidney Disease: Present Status*. Chung J, Spargo BH, Mostofi FK et Abell MR (eds). Williams & Wilkins Co. Baltimore, pp. 1-41.

Karttunen T, Risteli J, Autio-Harmainen H, Risteli L (1986) Effect of age and diabetes on type IV collagen and laminin in human kidney cortex. *Kidney Int* **30**, 586-591.

Kasinath BS, Kanwar YS (1993) Glomerular basement membrane: Biology and physiology: Dans: *Molecular and Cellular Aspects of Basement Membranes*. Rohrbach DH et Timpl R (eds). San Diego, Academic Press, pp. 89-106.

Katoh T, Chang H, Uchida S, Okuda T, Kurokawa K (1990) Direct effects of endothelin in the rat kidney. *Am J Physiol* **258**, F397-F402.

Kaysen GA, Myers BD, Couser WG, Rabkin R, Felts JM (1986) Mechanisms and consequences of proteinuria. *Lab Invest* **54**, 479-498.

Kerjaschki D, Sharkey DJ, Farquhar MG (1984) Identification and characterization of podocalyxin---the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J Cell Biol* **98**, 1591-1596.

Kerjaschki D, Sawada H, Farquhar M G (1986) Immunoelectron microscopy in kidney research. Some contributions and limitations. *Kidney Int* **30**, 229-245.

Kerjaschki D, Ojha PP, Susani M, Horvat R, Binder S, Hovorka A, Hillemanns P, Pytela R (1989) A β -1 integrin receptor for fibronectin in human kidney glomeruli. *Am J Pathol* **134**, 481-489.

Kern TS, Engerman TL (1990) Arrest of glomerulopathy in diabetic dogs by improved diabetic control. *Diabetologia* **21**, 178-183.

Khalifa A, Cohen MP (1975) Glomerular procollagen lysyl-hydroxylase activity in streptozotocin diabetes. *Biochem Biophys Acta* **386**,332-339.

Kim Y, Kleppel M, Butkowski R, Mauer M, Wieslander J, Michael A (1991) Differential expression of basement membrane collagen chains in diabetic nephropathy. *Am J Pathol* **138**, 413-420.

Kimmelstiel P, Wilson C (1936) Intercapillary lesions in the glomeruli of the kidney. *Am J Pathol* **12**, 83-105.

Kinoshita JH (1974) Mechanism initiating cataract formation. *Invest Ophthalmol* **13**, 713-724.

Kivirikko KL (1993) Collagens and their abnormalities in a wide spectrum of diseases. *Ann Med* **25**, 113-126.

Kjellen L, Lindahl U (1991) Proteoglycans: Structures and interactions. *Annu Rev Biochem* **60**, 443-475.

Kleppel MM, Fan WW, Cheong HI, Michael AF (1992) Evidence for separate networks of classical and novel basement membrane collagen. Characterization of $\alpha 3$ (IV)-Alport antigen heterodimer. *J Biol Chem* **267**, 4137-4142.

Koenig RJ, Blobstein SH, Cerami A (1982) Structure of carbohydrate and hemoglobin A. *J Biol Chem* **252**, 2992-2997.

Kowluru A, Kowluru R, Bitensky MW, Corwin EJ, Solomon S, Johnson JD (1987) Suggested mechanism for the selective excretion of glucosylated albumin. *J Exp Med* **166**, 1259-1279.

Kreisberg J, Venkatachalam M, Troyer D (1985) Contractile properties of cultured glomerular mesangial cells. *Am J Physiol* **249**, F457-F463.

Kreisberg J, Radnik RA, Ayo SH, Garoni JA, Saikumar P (1994) High glucose elevates *cfos* and *cjun* transcripts and proteins in mesangial cell cultures. *Kidney Int* **46**, 105-112.

Kriz W, Elger M, Lemley K, Sakai T (1990) Structure of the glomerular mesangium: A biochemical interpretation. *Kidney Int* **38** (Suppl 30), S2-S9.

Krolewski AS, Tryggvarson K, Warram JH (1990) Diabetic nephropathy and polymorphism in the gene coding for the alpha I chain of collagen IV. *Kidney Int* **37**, 510-518.

Kuhn K, Wiedemann H, Timpl R, Risteli J, Dieringer H, Voss T, Glanville RW (1981) Macromolecular structure of basement membrane collagens. *FEBS Lett* **125**, 123-128.

Lachapelle M, Bendayan M (1991) Contractile proteins in podocytes: Immunocytochemical localization of actin and alpha-actinin in normal and nephrotic rat kidneys. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **60**, 105-111.

Laliberté F, Sapin C, Belair MF, Druet P, Bariety J (1978) The localization of the filtration barrier in normal rat glomeruli by ultrastructural immunoperoxidase techniques. *Biol Cell* **31**, 15-26.

Lambert PP, Dubois R, Decoodt P, Gasse JP, Verniory A (1975) Determination of glomerular intracapillary and transcapillary pressure gradients from sieving data. II. A physiological study in the normal dog. *Pflügers Arch* **359**, 1-22.

Landis EM, Pappenheimer JR (1963) Exchange of substances through the capillary walls. Dans: *Handbook of Physiology, Section 2: Circulation*. Hamilton WF (ed). American Physiological Society, Washington, D.C, pp. 961-1034.

Larkins RG, Dunlop ME (1991) Prostaglandins, polyols and mesangial cell function in experimental diabetes. Dans: *Diabetes Excerpta Medica*. Rifkin H, Colwell JA et Taylor SI (eds). Amsterdam, pp. 180-183.

Lassen N (1970) Dans: *Capillary Permeability*. Crone CC et Lassen NA (eds). Academic Press, New York, pp. 549-551.

Latta H, Maunsbach AB, Madden SC (1960) The centrolobular region of the renal glomerulus studied by electron microscopy. *J Ultrastruct Res* **4**, 455.

Latta H (1970) The glomerular capillary wall. *J Ultrastruct Res* **32**, 526-544.

Latta H, Johnston WH, Stanley TM (1975) Sialoglycoproteins and filtration barriers in the glomerular capillary wall. *J Ultrastruct. Res* **51**, 354-376.

Laurens W, Battaglia C, Foglieni C, Devos R, Malanchini B, Van Damme B, Varenterghem Y, Remuzzi G, Remuzzi A (1995) Direct podocyte damage in the single nephron leads to albuminuria in vivo. *Kidney Int* **47**, 1078-1086.

Laurie GW, Bing JT, Kleinman HK, Hassell JR, Aumailley M, Martin GR, Feldmann RJ (1986) Localization of binding sites for laminin, heparan sulfate proteoglycan and fibronectin on basement membrane (type IV) collagen. *J Mol Biol* **189**, 205-216.

Layton GJ, Jerums G (1988) Effect of glycation of albumin on its renal clearance in normal and diabetic rats. *Kidney Int* **33**, 673-676.

Lindahl U, Höök M (1978) Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules. *Ann Rev Biochem* **47**, 385-417.

Lindmark R, Thoren-Tolling K, Sjöquist J (1983) Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera. *J Immunol Methods* **62**, 1-13.

Linker A, Hovingh P, Kanwar YS, Farquhar MG (1981) Characterization of heparan sulfate from dog glomerular basement membranes. *Lab Invest* **44**, 560-565.

Londoño I, Ghitescu L, Bendayan M (1995) Glomerular handling of circulating glycosylated albumin in the normal mouse kidney. *Am J Physiol* **268**, F913-F921.

Ludwig CF (1883) Beitrage zur Lehre vom Mechanismus der Harnsekretion. *Marburg*. Elwert NG (ed). 1-42.

Maillard LC (1912) Action des acides aminés sur les sucres: Formation des mélanoides par voie méthodique. *CR Acad Sci* **154**, 66-68.

Makino H (1982) Molecular sieve in rat glomerular basement membrane as revealed by negative staining. *Acta Med Okayama* **36**, 371-382.

Makino H, Yamasaki Y, Haramoto T, Shikata K, Hironaka K, Ota Z, Kanwar YS (1993) Ultrastructural changes of extracellular matrices in diabetic nephropathy revealed by high resolution scanning and immunoelectron microscopy. *Lab Invest* **68**, 45-55.

Makita ZH, Radoff S, Rayfield EJ, Yang Z, Skolnik E, Delaney V, Friedman EA, Cerami A, Vlassara, H (1991) Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *N Engl J Med* **325**, 836-842.

Mann K, Deutzmann R, Timpl R (1988) Characterization of proteolytic fragments of the laminin-nidogen complex and their activity in ligand-binding assays. *Eur J Biochem* **178**, 71-80.

Martin GR, Timpl R (1987) Laminin and other basement membrane components. *Ann Rev Cell Biol* **3**, 57-85.

Martinez-Hernandez A, Gay AS, Miller EJ (1982) Ultrastructural localization of type V collagen in rat kidney. *J Cell Biol* **92**, 343-349.

Mauer SM, Steffes MW, Sutherland DER, Najarian JS, Michael AF, Brown DM (1974) Studies of the rate of regression of the glomerular lesions in diabetic rats treated with pancreatic islet transplantation. *Diabetes* **24**, 280.

Mauer SM, Barbosa J, Vernier RL, Kjellstrand CM, Buselmeier TJ, Simmons RL, Najarian JS, Goetz FC (1976) Development of diabetic vascular lesions in normal kidneys transplanted into patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med* **295**, 916-920.

Mauer SM, Steffes MW Brown DM (1981) The kidney in diabetes. *Am J Med* **70**, 603-615.

Mauer SM, Steffes MW, Connett J, Najarian J, Sutherland DER, Barbosa J (1983) The development of lesions in the glomerular basement membrane and mesangium after transplantation of normal kidneys to diabetic patients. *Diabetes* **32**, 948-952.

Mayer U, Nischt R, Pöschl E, Mann K, Fukuda K, Gerl M, Yamada Y, Timpl R (1993) A single EGF like motif of laminin is responsible for high affinity nidogen binding. *EMBO J* **12**, 1879-1885.

Mayne R, Brewton RG (1993) New members of the collagen superfamily. *Curr Opin Cell Biol* **5**, 883-890.

McFarland KF, Catalano EW, Day JF, Thrope SR, Baynes JW (1979) Nonenzymatic glycosylation of serum proteins in diabetes mellitus. *Diabetes* **28**, 1011-1014.

Mc Lean IW, Nakane PK (1974) Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixative for immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem* **22**, 1077-1083.

McVerry BA, Hopp A, Fisher C, Huehns RR (1980) Production of pseudodiabetic renal glomerular changes in mice after repeated injection of glycosylated proteins. *Lancet* **2**, 738-740.

Michael AF, Blau E, Vernier RL (1970) Glomerular polyanion alteration in aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* **23**, 649-657.

Michael AF, Keane WF, Raij L, Vernier RL, Mauer SM (1980) The glomerular mesangium. *Kidney Int* **17**, 141-154.

Michael AF, Brown DM (1981) Increased concentration of albumin in kidney basement membranes in diabetes mellitus. *Diabetes* **30**, 843-846.

Michael AF, Yang JY, Falk RJ, Bennington MJ, Scheinman JI, Vernier RL, Fish AJ (1983) Monoclonal antibodies to human renal basement membranes: Heterogenic and ontogenic changes. *Kidney Int* **24**, 74-86.

Michels LD, Keane WF, Davidman M (1980) Glomerular function and albuminuria in alloxan diabetes: The effects of insulin. *Clin Res* **28** (abstract), 455A.

Michels LD, Davidman M, Keane WF (1982) Glomerular permeability to neutral and anionic dextrans in experimental diabetes. *Kidney Int* **21**, 699-705.

Miles AJ, Knutson JR, Skubitz APN, Furcht LT, McCarthy JB, Fields GB (1995) A peptide model of basement membrane collagen $\alpha 1$ (IV) 531-543 binds the $\alpha_3\beta_1$ integrin. *J Biol Chem* **270**, 29047-29050.

Miyata S, Monnier VM (1992) Immunocytochemical detection of advanced glycosylation end products in diabetic tissues using monoclonal antibody to pyrraline. *J Clin Invest* **89**, 1102-1112.

Mogensen CE (1971a) Glomerular filtration rate and renal plasma flow in normal and diabetic man during elevation of blood sugar levels. *Scand J Clin Lab Invest* **28**, 177-182.

Mogensen CE (1971b) Kidney function and glomerular permeability to macromolecules in early juvenile diabetes. *Scand J Clin Lab Invest* **28**, 79-90.

Mogensen CE, Andersen MJF (1973) Increased kidney size and glomerular filtration rate in early juvenile diabetes. *Diabetes* **22**, 706-712.

Mogensen CE, Steffes MW, Deckert T, Sandahl Christiansen J (1981) Functional and morphological renal manifestations in diabetes mellitus. *Diabetologia* **21**, 89-93.

Mohan PS, Karder WG, Spiro RG (1990) Occurrence of type VI collagen in extracellular matrix of renal glomeruli and its increase in diabetes. *Diabetes* **39**, 31-37.

Mohos SC, Skoza J (1969) Glomerular sialoprotein. *Science* **164**, 1519-1521.

Monnier V, Cerami A (1981) Nonenzymatic browning *in vivo*: Possible process for aging of long-lived proteins. *Science* **211**, 491-493.

Monnier V (1993) Glycosylation non-enzymatique des protéines. Complications du diabète, du vieillissement et de l'insuffisance rénale. *Presse Med* **22**, 1413-1418.

Moriya T, Ohno S, Nakazawa K, Shigematsu H, Yajima Y (1993a) Ultrastructural study of glomerular basement membrane in diabetic rats by quick-freezing and deep-etching method. *Virchows Arch [B]* **64**, 107-114.

Moriya T, Nakazawa K, Ito N, Shigematsu H, Okada N, Aizawa T, Yamada T, Yajima Y (1993b) Loss of glomerular anionic sites and the development of albuminuria in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Nephron* **65**, 444-448.

Moriya T, Ohno S, Yajima Y (1995) Three-dimensional ultrastructure of human glomerular basement membrane by a quick-freezing and deep-etching method. *Nephron* **70**, 72-76.

Moriya T, Ohno S, Tanaka K, Fujii Y, Yajima Y (1996) Effects of early insulin treatment on ultrastructural changes of glomeruli in diabetic rats revealed by the quick-freezing and deep-etching method. *Diabetologia* **39**, 632-640.

Morrison KE, Maryyama M, Yang-Feng TL, Reeders ST (1991) Sequence and localization of a partial cDNA encoding the human $\alpha 3$ chain of type IV collagen. *Am J Hum Genet* **49**, 545-554.

Mounier F, Foidart JM, Gubler MC (1986) Distribution of extracellular matrix glycoproteins during normal development of human kidney. *Lab Invest* **54**, 394-401.

Muir A, Schatz DA, Maclaren NK (1992) The pathogenesis, prediction, and prevention of insulin-dependant diabetes mellitus. *J Clin North Am* **21**, 199-219.

Mundel P, Elger M, Sakai T, Kriz W (1988) Microfibrils are a major component of the mesangial matrix in the glomerulus of the rat kidney. *Cell Tissue Res* **254**, 183-187.

Murtiashaw MH, Winterhalter KH (1986) Nonenzymatic glycation of human albumin does not alter its palmitate binding. *Diabetologia* **29**, 366-370.

Myers BD, Winetz JA, Chui F, Michaels AS (1982) Mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy: A study of glomerular barrier function. *Kidney Int* **21**, 633-641.

Nathan DM (1993) Long-term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med* **328**, 1676-1685.

Navar LG (1978) Renal autoregulation : Perspectives from whole kidney and single nephron studies. *Am J Physiol* **3**, F357-F370.

Nayak BR, Spiro RG (1991) Localization and structure of the asparagine-linked oligosaccharides of type IV collagen from glomerular basement membrane and lens capsule. *J Biol Chem* **266**, 13978-13987.

Nerlich AG, Schleicher ED, Wiest I, Specks V, Timpl R (1994) Immunohistochemical localization of collagen VI in diabetic glomeruli. *Kidney Int* **45**, 1648-1656.

Neuman RG, Hud E, Cohen MP (1994) Glycated albumin: A marker of glycemic status in rats with experimental diabetes. *Laboratory Animals* **28**, 63-69.

Ninomiya Y, Kagawa M, Iyama KI, Naito I, Kishiro Y, Seyer JM, Sugimoto M, Oohashi T, Sado Y (1995) Differential expression of two basement membrane collagen genes, COL4A6 and COL4A5, demonstrated by immunofluorescence staining using peptide-specific monoclonal antibodies. *J Cell Biol* **130**, 1219-1229.

Noonan DM, Hassell JR (1993) Proteoglycans of basement membranes Dans: *Molecular and Cellular Aspects of Basement Membranes*. Rohrbach DH et Timpl R (eds). San Diego, Academic Press, 189-210.

Oberbaumer I, Wiedemann H, Timpl R, Kuhn K (1982) Shape and assembly of type IV procollagen obtained from cell culture. *EMBO J* **1**, 805-810.

Olgemöller B, Schwaabe S, Gerbitz KD, Schleicher ED (1992) Elevated glucose decreases the content of a basement membrane-associated proteoglycan in proliferating mesangial cells. *Diabetologia* **35**, 183-186.

Oohashi T, Sugimoto M, Mattei MG, Ninomiya Y (1994) Identification of a new collagen IV chain, $\alpha 6$ (IV), by cDNA isolation and assignment of the gene to chromosome Xq22, which is the same locus for COL4A5. *J Biol Chem* **269**, 7520-7526.

Østerby R (1972) Morphometric studies of the peripheral glomerular basement membrane in early juvenile diabetes. I. Development of initial basement membrane thickening. *Diabetologia* **8**, 84-92.

Østerby R (1975) Early phases in the development of diabetic glomerulopathy : A quantitative electron microscopic study. *Acta Med Scand* **200** (suppl), 1-82.

Østerby R, Gundersen HJG (1980) Fast accumulation of basement membrane material and rate of morphological changes in acute experimental diabetic glomerular hypertrophy. *Diabetologia* **18**, 493-500.

Østerby R (1986) Structural changes in the diabetic kidney. *Clinics in Endo and Metab* **15**, 733-751.

Østerby R, Schmitz A, Nyberg G, Asplund J (1998) Renal structural changes in insulin-dependent diabetic patients with albuminuria. Comparison of cases with onset of albuminuria after short or long duration. *APMIS* **106**, 361-370.

Ott CE, Marchand GR, Diaz-Buxo J, Knox FG (1976) Determinants of glomerular filtration rate in the dog. *Am J Physiol* **231**, 2358-239.

Ott U, Odermatt E, Engel J, Furthmayr H, Timpl R (1982) Protease resistance and conformation of laminin. *Eur J Biochem* **123**, 63-72.

Park CH, Maack T (1984) Albumin absorption and catabolism by isolated perfused proximal convoluted tubules of the rabbit. *J Clin Invest* **73**, 767-777.

Park IS, Kiyomoto H, Abboud SL, Abboud HE (1997) Expression of transforming growth factor-beta and type IV collagen in early streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes*. **46**, 473-480.

Parving HH, Christiansen JS, Noer I, Tronier B, Mogensen CE (1980) The effect of glucagon infusion on kidney function in short-term insulin-dependent juvenile diabetes. *Diabetologia* **19**, 350-400.

Parthasarathy N, Spiro RG (1981) Characterization of the glycosaminoglycan component of the renal glomerular basement membrane and its relationship to the peptide portion. *J Biol Chem* **256**, 507-513.

Parthasarathy N, Spiro RG (1982) Effect of diabetes on the glycosaminoglycan component of the human glomerular basement membrane. *Diabetes* **31**, 738-741.

Paulsson M, Aumailley M, Deutzmann R, Timpl R, Beck K, Engel J (1987) Laminin-nidogen complex: Extraction with chelating agents and structural characterization. *Eur J Biochem* **116**, 11-19.

Pennell JP, Yanagawa N, Hwang KH, Millard MM, Bourgoignie JJ (1981) Glomerular selective permeability to macromolecular neutral dextrans in experimental diabetes. *Diabetologia* **20**, 223-227.

Pennell JP, Meinking TL (1982) Pattern of urinary proteins in experimental diabetes. *Kidney Int* **21**, 709-713.

Perejda A, Uitto J (1982) Nonenzymatic glycosylation of collagen and other proteins : Relationship to development of complications. *Collagen Rel Res* **2**, 81-88.

Petitjean P, Chantrel F, Hannedouche T (1996) Perméabilité sélective de la barrière de filtration glomérulaire chez l'homme. *Néphrologie* **17**, 113-116.

Pihlajaniemi T (1996) Molecular properties of the glomerular basement membrane. *Contrib Nephrol Basel Karger* **117**, 46-79.

Pitcock JA, Hartroft PM, Newmark LN (1959) Increased renal pressor activity (renin) in sodium deficient rats and correlation with juxtaglomerular cell granulation. *Proc Soc Exp Biol Med* **100**, 868.

Poduslo JF, Curran GL (1994) Glycation increases the permeability of proteins across the blood-nerve and blood-brain barriers. *Mol Brain Res* **23**, 157-162.

Pugliese G, Pricci F, Pesce C, Romeo G, Lenti E, Caltabiano V, Vetri M, Purrello F, Di Mario U (1997) Early, but not advanced , glomerulopathy is reversed by pancreatic islet transplants in experimental diabetic rats. *Diabetes* **46**, 1198-1206.

Purtell JN, Pesce AJ, Clyne DH, Miller WC, Pollak VE (1979) Isoelectric point of albumin: Effect on renal handling of albumin . *Kidney Int* **16**, 366-376.

Quinones S, Bernard D, Carcia-Sogo M, Elena SF, Saus J (1992) Exon / intron structure of the human $\alpha 3$ (IV) collagen gene encompassing the Goodpasture antigen ($\alpha 3$ (IV) NC1). *J Biol Chem* **267**, 19780-19784.

Rao CN, Margulies IMK, Tralka TS, Terranova VP, Madri JA, Liotta LA (1982) Isolation of a subunit of laminin and its role in molecular structure and tumor cell attachment. *J Biol Chem* **257**, 9740-9744.

Rasch R (1979a) Prevention of diabetic glomerulopathy in streptozotocin diabetic rats by insulin treatment. Glomerular basement membrane thickness. *Diabetologia* **16**, 319-324.

Rasch R (1979b) Prevention of diabetic glomerulopathy in streptozotocin diabetic rats by insulin treatment. The mesangial regions. *Diabetologia* **17**, 243-248.

Rasch R (1980) Prevention of diabetic glomerulopathy in streptozotocin diabetic rats. *Diabetes* **18**, 413-460.

Rasch R, Dørup J (1997) Quantitative morphology of the rat kidney during diabetes mellitus and insulin treatment. *Diabetologia* **40**, 802-809.

Reale E, Luciano L (1990) The lamina rara of the glomerular basement membrane. Their manifestation depends on the histochemical and histological technique. *Contrib Nephrol* **80**, 32-40.

Reeves WH, Kanwar YS, Farquhar MG (1980) Assembly of the glomerular filtration surface. Differentiation of anionic sites in glomerular capillaries of newborn rat kidney. *J Cell Biol* **85**, 735-753.

Regoli M, Bendayan M (1997) Alterations in the expression of the $\alpha_3\beta_1$ integrin in certain membrane domains of the glomerular epithelial cells (podocytes) in diabetes mellitus. *Diabetologia* **40**, 15-22.

Regoli M, Magro G, Grasso S, Bendayan M (1998) Type VI collagen in glomeruli of short-and long-term experimental diabetic rats. *J Histochemical* **30**, 13-20.

Regoli M, Bendayan M (1999) β_1 integrins expression in glomerular tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. Sous presse.

Reinhardt D, Mann K, Kischt R, Fox JW, Krieg T, Timpl R (1993) Mapping of nidogen binding sites for collagen type IV, heparan sulfate proteoglycan, and zink. *J Biol Chem* **268**, 10881-10887.

Rennke HG, Cotran RS, Venkatachalam MA (1975) Role of molecular charge in glomerular permeability: tracer studies with cationized ferritins. *J Cell Biol* **67**, 638-646.

Rennke HG, Patel Y, Venkatachalam MA (1978) Glomerular filtration of proteins: Clearance studies using neutral, anionic and cationic horseradish peroxidase. *Kidney Int* **13**, 278-288.

Rennke HG, Venkatachalam MA (1978) Glomerular permeability : *In vivo* tracer studies with polyanionic and polycationic ferritins. *Kidney Int* **11**, 44-53.

Rennke HG, Venkatachalam MA (1979) Glomerular permeability of macromolecules: Effect of molecular configuration on the fractional clearance of uncharged dextran and neutral horseradish peroxidase in the rat. *J Clin Invest* **63**, 713-717.

Renold AE, Mintz DH, Muller WA, Cahill GF (1978) Diabetes mellitus. Dans: *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. Stanbury JB, Wyngaarden JB et Frederickson DS (eds), New York, McGraw Hill, pp. 88-109.

Risteli J, Bachinger HP, Engel J, Furthmayr H, Timpl R (1980) 7-S collagen: Characterization of an unusual basement membrane structure. *Eur J Biochem* **108**, 239-250.

- Robertson CR, Denn WM, Troy JL, Brenner BM** (1972) Dynamics of glomerular ultrafiltration in the rat. III. Hemodynamics and autoregulation. *Am J Physiol* **223**, 1191-1200.
- Robinson LK, Murrah VA, Mayer MP, Rohrbach DH** (1989) Characterization of a novel glycoprotein isolated from the basement membrane matrix of the Engelbreth-Holm-Swarm tumor. *J Biol Chem* **264**, 5141-5147.
- Rodewald R, Karnovsky MJ** (1974) Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol* **60**, 423-433.
- Rohrbach DH, Hassell JR, Kleinman HK, Martin GR** (1982) Alterations in the basement membrane (heparan-sulfate) proteoglycan in diabetic mice. *Diabetes* **31**, 185-188.
- Rohrbach DH, Wagner CW, Star VL, Martin GR, Brown KS** (1983) Reduced synthesis of basement membrane heparan sulfate proteoglycan in streptozotocin-induced diabetic mice. *J Biol Chem* **258**, 11672-11677.
- Rouillier C** (1969) General anatomy and histology of the kidney. Dans: *The Kidney: Morphology, Biochemistry, Physiology*. Muller AF (ed). Academic Press, New York, pp. 61.
- Ruderman NB, Williamson JR, Brownlee M** (1992) Glucose and diabetic vascular disease. *FASEB J* **6**, 2905-2914.
- Ryan GB, Karnovsky MJ** (1976) Distribution of endogenous albumin in the rat glomerular: Role of hemodynamic factors in glomerular barrier function. *Kidney Int* **9**, 36-45.
- Sabbatini M, Sansone G, Uccello F, Giliberti A, Conte G, Andreucci VE** (1992) Early glycosylation products induce glomerular hyperfiltration in normal rats. *Kidney Int* **42**, 875-881.

Sakashita S, Engvall E, Ruoslahti E (1980) Basement membrane glycoprotein laminin binds to heparin. *FEBS Lett* **116**, 243-246.

Sampietro T, Colantuoni A, Lenzy S, Bertuglia S, Bionda A, Donato L (1987) Increased permeability of hamster microcirculation to glycosylated albumin. *The Lancet* **2**, 994-996.

Sariola H, Timpl R, von der Mark K, Mayne R, Fitch JM, Linsenmayer TF, Ekblom P (1984) Dual origin of glomerular basement membrane. *Dev Biol* **101**, 86-96.

Sariola H, Hostikka SL, Lukkarila S, Tryggvason K (1996) Distribution of type IV collagen $\alpha 1$, $\alpha 2$, and $\alpha 5$ chains in human tissues. *Contrib Nephrol Basel, Karger* **117**, 130-141.

Schleicher E, Wieland OH (1984) Changes of human glomerular basement membrane in diabetes mellitus. *J Clin Chem Clin Biochem* **22**, 223-227.

Schleicher ED, Wieland OH (1986) Kinetic analysis of glycation as a tool for assessing the half-life of proteins. *Biochim Biophys Acta* **884**, 199-205.

Schleicher ED, Kolm V, Ceol M, Nerlich A (1996) Structural and functional changes in diabetic glomerulopathy. *Kidney Blood Press Res* **19**, 305-315.

Schlondorff D (1987) The glomerular mesangial cell: An expanding role for a specialized pericyte. *FASEB J* **1**, 272-281.

Schnabel E, Anderson JM, Farquhar MG (1990) The tight junction protein ZO-1 is concentrated along the slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J Cell Biol* **111**, 1255.

Schreiner GF, Cotran RS (1982) Localizing of a Ia-bearing glomerular cell in the mesangium. *J Cell Biol* **94**, 483-488.

Seiler MW, Venkatachalam MA, Cotran RS (1975) Glomerular epithelium: Structural alterations induced by polycations. *Science* **189**, 390-393.

Seiler MW, Rennke HG, Cotran RS, Venkatachalam MA (1977) Pathogenesis of polycation-induced alterations ("fusion") of glomerular epithelium. *Lab Invest* **36**, 48-61.

Sell DR, Monnier VM (1989) Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. *J Biol Chem* **264**, 21596-21602.

Seyer-Hansen (1977) Renal hypertrophy in experimental diabetes: Relation to severity of diabetes. *Diabetologia* **13**, 141-143.

Shaklai N, Garlick RL, Bunn HF (1984) Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function. *J Biol Chem* **259**, 3812-3817.

Shima K, Shi K, Noma Y (1991) High performance liquid chromatographic assay of rat serum glycated albumin. *Diabetes* **40** (suppl 1) (abstract),205A.

Shimomura H, Spiro RG (1987) Studies on macromolecular components of human glomerular basement membrane and alterations in diabetes: Decreased levels of heparan sulfate proteoglycan and laminin. *Diabetes* **36**, 374-381.

Siebold B, Qian RA, Glanville RW, Hofmann H, Deutzmann R, Kuhn K (1987) Construction of the model for the aggregation and cross-linking region (7S domain) of type IV collagen based upon an evaluation of the primary structure of the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains in this region. *Eur J Biochem* **168**, 569-575.

Siebold B, Deutzmann R, Kuhn K (1988) The arrangement of intra- and intermolecular disulfide bonds in the carboxyterminal, noncollagenous aggregation and cross-linking domain of basement-membrane type IV collagen. *Eur J Biochem* **176**, 617-624.

- Simionescu N** (1979) Enzymatic tracers in the study of vascular permeability. *J Histochem Cytochem* **27**, 1120-1130.
- Simionescu M, Simionescu N, Silbert JE, Palade GE** (1981) Differentiated microdomains on the luminal surface of the capillary endothelium. II. Partial characterization of their anionic sites. *J Cell Biol* **90**, 614-621.
- Siperstein MD, Unger RH, Madison LL** (1968) Studies of muscle capillary basement membranes in normal subjects, diabetic, and pre-diabetic patients. *J Clin Invest* **47**, 1973-1999.
- Smith KR, Borchardt RT** (1989) Permeability and mechanism of albumin, cationized albumin, and glycosylated albumin transcellular transport across monolayers of culture bovine brain capillary endothelial cells. *Pharmacol Res* **6**, 466-473.
- Spiro RG, Spiro MJ** (1971) Effect of diabetes on the biosynthesis of the renal glomerular basement membrane : Studies on the glucosyltransferase. *Diabetes* **20**, 641-648.
- Spiro RG** (1976) Search for a biochemical basis of diabetic microangiopathy. *Diabetologia* **12**, 1-14.
- Sraer JD, Sraer J, Ardaillou R, Mimoune O** (1974) Evidence for renal glomerular receptors for angiotensin II. *Kidney Int* **6**, 241-246.
- Steffes MW, Buchwald H, Wigness, BD, Groppoli TJ, Rupp WM, Rohde TD, Blackshear PJ, Mauer SM** (1982) Diabetic nephropathy in the uninephrectomized dog: Microscopic lesions after one year. *Kidney Int* **21**, 721-740.
- Steffes MW, Barbosa J, Basgen JM, Sutherland DE, Najarians JS, Mauer SM** (1983) Quantitative glomerular morphology of the normal human kidney. *Lab Invest* **49**, 82-86.

Steffes MW and Mauer SM (1984) Diabetic glomerulopathy in man and experimental animal models. *Int Rev Exp Pathol* **26**, 147-175.

Steinhausen M, Blum M, Fleming JT, Holz FG, Parekh N, Weigman DL (1989) Visualization of renal autoregulation in the split hydronephrotic kidney of rats. *Kidney Int* **35**, 1151-1160.

Stow JL, Sawada H, Farquhar MG (1985) Basement membrane heparan sulfate proteoglycans are concentrated in the lamina rara and in podocytes of the rat renal glomerulus. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 3296-3300.

Striker GE, Lange Ma, MacKay K, Bernstein K, Striker LJ (1987) Glomerular cells in vitro. *Adv Nephrol* **16**, 169-186.

Sugimoto M, Oohashi T, Yoshioka H, Matsuo N, Ninomiya Y (1993) cDNA isolation and partial gene structure of the human $\alpha 4$ (IV) collagen chain. *FEBS Lett* **330**, 122-128.

Suzuki D, Miyazaki M, Jinde K, Koji T, Yagame M, Endoh M, Nomoto Y, Sakai H (1997) In situ hybridization studies of matrix metalloproteinase-3 tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and type IV collagen in diabetic nephropathy. *Kidney Int* **52**, 111-119.

Tamsma JT, van den Born J, Bruijn JA, Assmann KJM, Weening JJ, Berden JHM, Wieslander J, Schramer E, Heermans J, Veerkamp JH, Lemkes HHPJ, van der Woude J (1994) Expression of glomerular extracellular matrix components in human diabetic nephropathy: Decrease of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. *Diabetologia* **37**, 313-320.

Timpl R, Rohde H, Gehron Robey P, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR (1979) Laminin - a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* **254**, 9933-9937.

Timpl R, Wiedemann H, van Delden V, Furthmayr H, Kühn K (1981) A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur J Biochem* **120**, 203-211.

Timpl R, Dziadek M, Fujiwara S, Nowack H, Wick G (1983) Nidogen: A new, self-aggregating basement membrane protein. *Eur J Biochem* **137**, 455-465.

Timpl R, Dziadek M (1986) Structure, development, and molecular pathology of basement membranes. *Int Rev Exp Pathol* **29**, 1-112

Timpl R (1989) Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur J Biochem* **180**, 487-502.

Thorning D, Vracko R (1977) Renal glomerular basal lamina scaffold. Embryological development, anatomy, and role in cellular reconstruction of rat glomeruli injured by freezing and thawing. *Lab Invest* **37**, 105-119.

Tonder KH, Aukland K (1979) Glomerular capillary pressure in the rat. *Acta Physiol Scand* **106**, 93-95.

Tomino Y, Wang LN, Fukui M, Yaguchi Y, Koide H (1991) Glomerular non-enzymatic glycosylation and lipid peroxide are increased in the early phase of streptozotocin-induced diabetic rats to major histopathologic alterations. *Nephron* **59**, 632-636.

Trueb B, Fluckiger R, Winterhalter KH (1984) Non-enzymatic glycosylation of basement membrane collagen in diabetes mellitus. *Coll Relat Res* **4**, 239-251.

Tryggvason K (1993) The laminin family. *Curr Opin Cell Biol* **5**, 877-882.

Tsilibary EC, Charonis AS (1986) The role of the main noncollagenous domain (NCI) in type IV collagen self-assembly. *J Cell Biol* **103**, 2467-2473.

Tsilibary EC, Charonis AS, Reger LA, Wohlhueter RM, Furcht LT (1988) The effect of nonenzymatic glucosylation on the binding of the main noncollagenous NC1 domain to type IV collagen. *J Biol Chem* **263**, 4302-4308.

Uitto J, Perejda AJ, Grant GA, Rowold EA, Kilo C, Williamson JR (1982) Glycosylation of human glomerular basement membrane collagen: Increased content of hexose in the ketoamine linkage and unaltered hydroxylysine glycosides in patients with diabetes. *Connect Tissue Res* **10**, 287-296.

Unger RH (1976) Diabetes and the alpha cell. *Diabetes* **25**, 136.

Vasmant D, Maurice M, Feldmann G (1984) Cytoskeleton ultrastructure of podocytes and glomerular endothelial cells in man and in the rat. *Anat Rec* **210**, 17-24.

Venkatachalam MA, Karnovsky MJ, Fahimi HD, Cotran RS (1970) An ultrastructural study of glomerular permeability using catalase and peroxidase as tracer proteins. *J Exp Med* **132**, 1153-1167.

Venkatachalam MA, Kreisberg JL (1985) Agonist induced isotonic contraction in cultured mesangial cells after multiple passage. *Am J Physiol* **249**, C48-C55.

Vernier RL, Birch-Anderson A (1962) Studies of the human fetal kidney. I. Development of the glomerulus. *J Pediatr* **60**, 754-767.

Vernier RL, Birch-Anderson A (1963) Studies of the human fetal kidney. II. Permeability characteristics of the developing glomerulus. *J Ultrastruct Res* **8**, 66-88.

Vernier RL, Steffes ME, Sissons-Ross S, Mauer M (1992) Heparan sulfate proteoglycan in the glomerular basement membrane in type. I. Diabetes mellitus. *Kidney Int* **41**, 1070-1080.

Verwey EF (1940) A type-specific protein derived from the staphylococcus. *J Exp Med* **71**, 635-644.

Viberti GC, Pickup JC, Jarrett RJ, Keen H (1979) Effect of control of blood glucose on urinary excretion of albumin and β -microglobulin in insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med* **300**, 638-641.

Viberti GC, MacKintosh D, Bilous RW, Pickup JC, Kleen H (1982) Proteinuria in diabetes mellitus: Role of spontaneous and experimental variation of glycemia. *Kidney Int* **21**, 714-720.

Viberti GC, MacKintosh D, Keen H (1983) Determinants of the penetration of proteins through the glomerular barrier in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* **32** (Suppl 2), 92-95.

Viberti GC, Wiseman MJ (1986) The kidney in diabetes: Significance of the early abnormalities. *Clin Endocrinol Metab* **15**, 753-782.

Villaschi S, Johns L, Cirigliano M, Pietra GG (1986) Binding and uptake of native glycosylated albumin-gold complexes in perfuse rat lungs. *Microvascular Research* **32**, 190-100.

Vittinghus E, Mogensen CE (1982) Graded exercise and protein excretion in diabetic man and the effect of insulin treatment. *Kidney Int* **21**, 725-729.

Vlassara H, Brownlee M, Manogue K, Dinarello C, Pasagian A (1988) Cachectin / TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: Role in normal tissue remodeling. *Science* **240**, 1546-1548.

Vlassara H (1996) Protein glycation in the kidney: Role in diabetes and aging. *Kidney Int* **49**, 1795-1804.

Wahl P, Deppermann D, Hasslacher C (1982) Biochemistry of glomerular basement membrane of the normal and diabetic human. *Kidney Int* **21**, 744-749.

Walker F (1973) The origin, turnover, and removal of glomerular basement membrane. *J Pathol* **110**, 233-244.

Wan YJ, Wu TC, Chung AE, Damjanov I (1984) Monoclonal antibodies to laminin reveal the heterogeneity of basement membranes in the developing and adult mouse tissues. *J Cell Biol* **98**, 971-979.

Wayner EA, Carter WG (1987) Identification of multiple cell adhesion receptors for collagen and fibronectin in human fibrosarcoma cells possessing unique alpha and common β subunits. *J Biol Chem* **105**, 1873-1884.

Wehner H, Petri M (1983) Glomerular alterations in experimental diabetes of the rat. *Path Res Pract* **176**, 145-157.

Westberg MG, Michael AF (1973) Human glomerular basement membrane: Chemical composition in diabetes mellitus. *Acta Med Scand* **194**, 39-47.

Wieland OH (1983) Protein modification by non enzymatic glucosylation: Possible role in the development of diabetic complications. *Mol Cell Endocrinol* **29**, 125-131.

Williams SK, Devenny JJ, Bitensky MW (1981) Micropinocytic injection of glycosylated albumin by isolated microvessels. Possible role in pathogenesis of diabetic microangiopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* **178**, 2393-2397.

Williams SK, Siegal RK (1985) Preferential transport of non-enzymatically glucosylated ferritin across the kidney glomerulus. *Kidney Int* **28**, 146-152.

Williamson JR, Kilo C (1977) Current status of capillary basement membrane disease in diabetes mellitus. *Diabetes* **26**, 65-73.

Winetz JA, Golbetz HV, Spencer RJ, Lee JA, Myers BD (1982) Glomerular function in advanced human diabetic nephropathy. *Kidney Int* **21**, 750-756.

Wingen AM, Dohner H, Scharer K, Rauterberg EW (1987) Evidence for developmental changes of type IV collagen in glomerular basement membrane. *Nephron* **45**, 302-305.

Wolf G, Sharma K, Chen Y, Ericksen M, Zyadeh FN (1992) High glucose-induced proliferation in mesangial cells is reserved by autocrine TGF- β . *Kidney Int* **42**, 647-656.

Woodrow D, Moss J, Shore I, Spiro RG (1992) Diabetic glomerulosclerosis. Immunogold ultrastructural studies on the glomerular distribution of type IV collagen and heperan sulphate proteoglycan. *J Pathology* **167**, 49-58.

Wright FS, Briggs JP (1979) Feedback control of glomerular blood flow, pressure and filtration rate. *Physiol Rev* **59**, 958-1006.

Wu VY, Cohen MP (1995) Evidence for a ligand receptor system mediating the biologic effects of glycated albumin in glomerular mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **207**, 521-528.

Wu K, Setty S, Mauer SM, Killen P, Nagase H, Michael AF, Tsilibary EC (1997) Altered kidney matrix gene expression in early stages of experimental diabetes. *Acta Anat* **158**, 155-165.

Yamada E (1955) The fine structure of the renal glomerulus of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol* **1**, 551-558.

Yamamoto T, Yamamoto K, Kawasaki K, Yaoita E, Shimizu F, Kihara I (1986) Immunoelectron microscopic demonstration of THY-1 antigen on the surface of mesangial cells in the rat glomerulus. *Nephron* **43**, 293-298.

Yamamoto T, Nakamura T, Noble NA, Ruoslahti E, Border WA (1993) Expression of transforming growth factor β is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 1814-1818.

Yang CW, Hattori M, Vlassara H, He CJ, Carome MA, Yamato E, Elliot S, Striker GE, Striker LJ (1995) Overexpression of transforming growth factor-beta 1 mRNA is associated with up-regulation of glomerular tenascin and laminin gene expression in nonobese diabetic mice. *J Am Soc Nephrol*. **5**, 1610-1617.

Yki-Järvinen H (1994) Pathogenesis of non-insulin-dependant diabetes mellitus. *Lancet* **343**, 91.

Yurchenco PD, Furthmayr H (1984) Self-assembly of basement membrane collagen. *Biochemistry* **23**, 1839-1850.

Yurchenco PD, Tsilibary EC, Charonis AS, Furthmayr H (1986) Models for the self-assembly of basement membrane. *J Histochem Cytochem* **34**, 93-102.

Yurchenco PD, Shittny JC (1990) Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J* **4**, 1577-1590.

Yurchenco PD, O'Rear J (1993) Supramolecular organization of basement membranes. Dans: *Molecular and Cellular Aspects of Basement Membranes*. Rohrbach DH et Timpl R (eds). San Diego, Academic Press, pp. 19-47.

Zhou J, Mochizuki T, Smeets H, Antignac C, Laurila P, de Paepe A, Tryggvason K, Reeders ST (1993) Deletion of the paired $\alpha 5$ (IV) and $\alpha 6$ (IV) Collagen genes in inherited smooth muscle tumors. *Science* **261**, 1167-1169.

Zimmermann KW (1933) Über den Bau des glomerulus der Säugetierrniere. *Z Mikrosk Anat Forsch* **32**, 176.

Ziyadeh FN, Cohen MP (1993) Effects of glycated albumin on mesangial cells: Evidence for a role in diabetic nephropathy. *Mol Cell Biochem* **125**, 19-25.

Ziyadeh FN, Sharma K, Ericksen M, Wolf G (1994) Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by activation of transforming growth factor β . *J Clin Invest* **93**, 536-542.

Ziyadeh FN, Han DC, Cohen JA, Guo J, Cohen MP (1998) Glycated albumin stimulates fibronectin gene expression in glomerular mesangial cells: Involvement of the transforming growth factor- β system. *Kidney Int* **53**, 631-638.

Zhu D, Kim Y, Steffes MW, Groppoli TJ, Butkowski RJ, Mauer SM (1994)
Application of electron microscopic immunocytochemistry to human kidney:
Distribution of type IV and type VI collagen in normal human kidney. *J Histochem
Cytochem* **42**, 577-584.

REMERCIEMENTS

Dans un premier temps, je tiens à remercier le Docteur **Moïse Bendayan**, mon directeur de recherche, qui a su me guider et m'encourager tout au long de ma maîtrise. Dr Bendayan, merci de votre patience, merci pour tout.

Irène, Oh ! Irène, que ferais-je sans toi...Je tiens à remercier le Docteur **Irène Londoño** pour sa patience sans limite, pour sa gentillesse, son encouragement et bien sûr, pour toutes les gommes qu'elle m'a données. Irène, tu vas me manquer à Houston, mais il faut maintenant que je prenne mon envol, comme une grande fille. Chère Irène, merci pour tout.

Je tiens à remercier **Diane Gingras** pour m'avoir encouragé tout au long de ma maîtrise. Merci Diane pour les bons conseils et ne change jamais, tu es une femme extraordinaire! Merci pour tout.

Je teins à remercier mon très cher collègue, **Gaétan Mayer** pour m'avoir si bien montré les rudiments de l'immunocytochimie mais surtout pour son encouragement lors des examens. Lâche pas Gaétan, tu vas aller loin. Merci pour tout.

Je voudrais remercier **Johanne Chaîney, Jean Léveillé et Michel Lauzon** pour leur support technique.

Je désire remercier **Ariel Arias, Line Roy, Phoung Nguyen** ainsi que **Kourosh Arshi et Pascal Bouchard**, pour les discussions stimulantes. Bonne chance les copains...

Je remercie le Docteur **Nadine Bruneau** pour l'aide qu'elle m'a apportée en biochimie. J'ai eu beaucoup de plaisir en ta présence. Je ne t'oublierai jamais.

Pascal Bouchard, mon danseur préféré. Je n'oublierai jamais nos moments passés dans la chambre noire... Merci et bonne chance avec tes cerveaux de rat!

Je voudrais aussi remercier mes amis, **Martine Quintal**, **Jean-François Dermine** et **Sophie Duclos** pour leur amitié. Vous resterez toujours dans mon cœur.

Maman, qu'aurais-je fais sans toi...Je n'ai pas assez de mots pour te remercier. Je tiens particulièrement à remercier ma mère, **Réjeanne**, pour tout ce qu'elle a fait pour moi. Ce mémoire contient un peu de toi...et j'en suis très fière. Merci pour ton amour, moi aussi je t'aime.

Papa, je voudrais te remercier d'être toujours présent quand j'ai besoin de toi. Merci pour toutes les belles valeurs que tu m'as inculquées. Tu n'as pas eu de garçon, mais je te promets que tu seras toujours fier de tes deux filles... Je t'aime.

Merci "**Sister**" pour tous les mots d'encouragement. Je suis fière d'être ta sœur et ne change pas. N'oublie pas que je suis toujours là pour toi. Je t'aime.

Bao, sans toi la vie ne serait pas aussi passionnante!!!

Je tiens à remercier le Docteur **Eugenio Rasio** ainsi que **Marie-Paule Dea** pour leur accueil chaleureux. Marie-Paule, tu m'as beaucoup appris, sur la science et sur la vie, merci.

Je remercie le Conseil de recherches médicales du Canada (**CRM**) pour le soutien financier.

Je n'ai pas assez de mots pour vous dire combien je vous aime tous,

Au revoir

Michèle xox