

2m 11.2574.2

Université de Montréal

**LE TRANSPORT D'ALBUMINE
DANS LE TUBULE PROXIMAL**

par

Marie-Odile Richard

Département de Physiologie

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 physiologie

janvier 1997

@ Marie-Odile Richard, 1996.



w

4

058

1997

v.072

Université de Montréal
Faculté des Etudes Supérieures

Ce mémoire intitulé:

Le transport d'albumine dans le tubule proximal

présenté par:

Marie-Odile Richard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Présidente du jury: Josette Noël

Directeur de recherche: Patrick Vinay

Membre du jury: Michel Bergeron

Mémoire accepté le: 06.02.1997

SOMMAIRE

Afin d'étudier le processus de transport rénal d'albumine, nous avons mis au point une technique permettant de mesurer ce transport par des segments isolés de tubules proximaux de rein de chien in vitro. De l'albumine marquée au Bleu Evans (BE) est présentée à ces tubules et l'accumulation cellulaire du BE est utilisée comme index de transport d'albumine. L'accumulation de BE observée après exposition des tubules au BE seul a été comparée à celle observée après leur exposition aux complexes albumine:BE, la liaison s'effectuant avec différents rapports de ces complexes albumine:BE.

Nous avons établi que l'accumulation lysosomiale de BE témoignait d'un transport de l'albumine.

Nous montrons que ce transport est supprimé par une hypothermie (37°C versus 4°C), par l'anoxie (demande de l'énergie), par des inhibiteurs de la synthèse d'ATP (KCN, penténoate-4), par la cytochalasine B mais pas par la colchicine.

Le transport d'albumine est influencé par les charges cationiques portées par cette molécule. En effet, un excès de BE (complexes albumine:BE saturés de BE) réduit le transport d'albumine.

L'osmolarité (de 300 à 600 mOsm) inhibe également ce transport.

L'acidification des compartiments vésiculaires impliqués dans le cycle d'endocytose est importante pour le transport puisque son inhibition par la bafilomycine (H^+ -ATPase), le DIDS (canaux chlore compensant le potentiel membranaire), le NH_3 (liaison du H^+ intra-vésiculaire) montre le même effet sur le transport d'albumine. Par contre, l'amiloride qui inhibe les échangeurs Na^+/H^+ (NHE-3) n'a pas d'effet sur le transport mais semble accroître la liaison de l'albumine aux récepteurs de la membrane de la bordure en brosse.

On peut conclure que les mécanismes d'acidification luminale et endosomiale peuvent affecter différemment le transport d'albumine dans des suspensions tubulaires proximales. De plus, le transport d'albumine par le tubule proximal est un processus rapide et potentiellement considérable. Toute réduction du transport tubulaire pourrait se traduire par un accroissement important de la protéinurie. Cette anomalie ne reflète donc pas le seul dommage tubulaire mais aussi le transport de l'albumine.

Finalement, nous avons spéculé sur les conséquences du catabolisme rénal accru d'albumine au cours des néphropathies. Ce catabolisme peut en effet conduire à une toxicité tubulaire qui contribue peut-être au développement de la néphropathie.

L'ensemble de notre réflexion nous amène à conclure qu'une intervention précoce réduisant la fuite glomérulaire d'albumine pourrait améliorer la condition du patient atteint de diabète.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
TABLE DES MATIÈRES..	v
Liste des tableaux...	xv
Liste des figures.....	xvi
Liste des abréviations.....	xx
DÉDICACE	xxv
REMERCIEMENTS.	xxvi

INTRODUCTION

CHAPITRE I. GÉNÉRALITÉS SUR L'ALBUMINE.....	1
1. STRUCTURE DE L'ALBUMINE	1
1.1. Structure primaire	3
1.2. Structures secondaire et tertiaire	4
2. LIGANDS ET SITES DE LIAISON SUR L'ALBUMINE.....	8
2.1. Le site I.....	8
2.2. Le site II.....	10
2.3. Le site III	11
2.4. Le site IV	12
2.5. Le site V	12
3. DONNÉES PHYSIOLOGIQUES DE L'ALBUMINE	15
3.1. Méthodes de mesure de la concentration d'albumine	16

3.2. Albumine dans l'espace plasmatique	16
3.3. Albumine dans l'espace interstitiel	17
4. DISTRIBUTION ET MÉTABOLISME DE L'ALBUMINE.....	18
4.1. Définition.....	18
4.2. Valeurs normales	19
4.3. Valeurs pathologiques	20
5. PROPRIÉTÉS ET FONCTIONS DE L'ALBUMINE.....	21
5.1. Transporteur	21
5.2. Nutriment.....	22
5.3. Agent oncotique	22
6. SYNTHÈSE DE L'ALBUMINE	23
6.1. Méthodes de mesure de synthèse d'albumine in vivo.....	26
6.2. Méthodes de mesure de synthèse d'albumine au niveau moléculaire	28
6.3. Facteurs influençant la synthèse d'albumine	30
6.3.1. Le jeûne et la malnutrition.....	30
6.3.2. Les acides aminés	31
6.3.3. Les hormones	31
6.3.4. Éthanol et tétrachlorure de carbone	32
6.3.5. L'acétaldéhyde	32
6.3.6. La pression colloïdale osmotique	33
6.3.6.1. État normal	33
6.3.6.2. États pathologiques.....	34

CHAPITRE II. TRANSPORT RÉNAL DE L'ALBUMINE	36
1. FILTRATION DE L'ALBUMINE	36
1.1. Permsélectivité de la paroi capillaire glomérulaire normale	37
1.1.1. La taille moléculaire	38
1.1.2. La charge moléculaire	40
1.1.3. La configuration moléculaire	41
1.1.4. L'hémodynamique glomérulaire	41
1.2. Filtration de l'albumine chez l'individu normal	42
1.2.1. Structure des membranes basales capillaires	42
1.2.1.1. Collagène	44
1.2.1.2. Laminine	45
1.2.1.3. Fibronectine	45
1.2.1.4. Protéoglycans	45
1.2.2. Fonction des membranes basales capillaires	46
1.3. Filtration d'albumine chez l'individu diabétique	47
1.3.1. Structure des membranes basales capillaires	47
1.3.1.1. Collagène	48
1.3.1.2. Protéoglycans	49
1.3.1.3. Fibronectine	50
1.3.1.4. Laminine	50
1.3.1.5. Acides aminés	50
2. RÉABSORPTION DE L'ALBUMINE	51
2.1. Mécanismes	53
2.1.1. Endocytose en phase fluide	54
2.1.2. Endocytose d'adsorption	54

2.1.2.1. Passage transcellulaire de l'albumine	55
2.1.3. Cinétique de l'absorption et du catabolisme	56
2.1.4. Aspects quantitatifs de l'absorption et du catabolisme	56
2.2. Interrelation entre le T _m d'absorption et les charges normalement filtrées de la protéine.....	58
2.3. Albumine cationique	59
2.4. Surcharge et transport intracellulaire	62
2.5. Variation de l'absorption de l'albumine avec l'âge	62
2.6. Mécanismes cellulaires de l'endocytose	63
2.6.1. Transport luminal de l'albumine.....	63
2.6.1.1. Fonctions des endosomes	64
2.6.1.2. Dissociation du récepteur et de l'albumine dans les endosomes.....	66
2.6.1.3. Dégradation de l'albumine dans les lysosomes	67
2.6.1.3.1. Protéinases acides	68
2.6.1.3.1.1. Fucosidase et phosphatase acide	68
2.6.1.3.1.2. Cathepsines tissulaires.....	69
i) Généralités	69
ii) Implication des enzymes lysosomiaux dans différents tissus	69
iii) Cathepsine D.....	70
iv) Cathepsine H.....	70
v) Cathepsines B et L	70
2.6.1.3.1.3. Cathepsines urinaires.....	75
2.6.1.3.2. Inhibiteurs des protéinases	77
2.6.1.4. Recyclage du ligand et de la membrane endosomiale.....	79
2.6.1.5. Effet du pH lysosomal.....	80
2.6.2. Transport baso-latéral de l'albumine	81

2.7. Méthodes de mesure de l'endocytose	82
2.7.1. Fluorescence et microscopie électronique	83
2.7.1.1. Transport d'albumine-FITC par des cellules rénales	
d'opossum	83
2.7.1.1.1. Cinétique du transport	83
2.7.1.1.2. Effet de la température.	84
2.7.1.1.3. Effet de l'hyperosmolarité	85
2.7.1.1.4. Effet du pH	86
2.7.1.1.5. Effet du sérum foetal	87
2.7.2 Préparations de rein de rat isolé perfusé	88
2.7.2.1. Effet de l'albumine	88
2.7.2.2. Effet de la température	89
2.8. Inhibiteurs de l'absorption de l'albumine	90
2.8.1. a.a. basiques	90
2.8.2. Cytochalasine B	92
2.8.3. Iodoacétate	92
2.8.4. Chloroquine	93
2.8.5. NH ₄ Cl	93
2.8.5.1. Rôles in vitro	93
2.8.5.2. Rôles in vivo	93
2.8.5.2.1. Hypertrophie cellulaire	94
2.8.5.2.2. Diminution de l'activité protéolytique	94
2.8.5.2.3. NH ₄ ⁺ et l'échangeur Na ⁺ /H ⁺	96
3. CATABOLISME DE L'ALBUMINE	97
3.1. Généralités	97
3.2. Méthodes de mesure du catabolisme	97
3.2.1. Clairance métabolique	98

3.2.2. Courbe de disparition plasmatique	98
3.3. Valeurs normales de catabolisme	98
3.4. Valeurs pathologiques de catabolisme	99
3.4.1. Diminution du catabolisme	99
3.4.2. Augmentation du catabolisme	99
4. MESURE DU TRANSPORT RENAL D'ALBUMINE SUR DES TUBULES	
PROXIMAUX ISOLÉS.....	101
4.1. Bleu d'Evans	101
4.2. Liaison du BE à l'albumine	101
4.3. Devenir du BE injecté i.v.	104
4.4. Utilisation clinique du BE	109
4.5. Transport des protéines liées au rouge brillant.....	110
4.6. Suivi temporel du BE dans le rein	110
4.7. Transport rénal de lysosomes par des tranches de rein	112
5. PRINCIPAUX TRANSPORTEURS DU TUBULE PROXIMAL	
SUSCEPTIBLES D'INFLUENCER LE CATABOLISME DE L'ALBUMINE.....	114
5.1. ATPases de type P: la Na ⁺ -K ⁺ ATPase	115
5.1.1. Structure de la Na ⁺ -K ⁺ ATPase	116
5.1.2. Mécanisme d'action de la Na ⁺ -K ⁺ ATPase.....	117
5.1.3. Cinétique de la Na ⁺ -K ⁺ ATPase	118
5.2. ATPases de type V	119
5.2.1. H ⁺ -ATPase de la MBB rénale	119
5.2.2. H ⁺ -ATPase vacuolaire	120
5.3. ATPases de type F.....	122
5.4. Échangeur Na ⁺ /H ⁺	123
5.4.1. Généralités	123

5.4.2. Rôles des échangeurs Na^+/H^+	123
5.4.3. Isoformes des échangeurs Na^+/H^+	124
5.4.4. Caractéristiques des échangeurs Na^+/H^+	127
5.4.5. Sites de liaison sur les échangeurs Na^+/H^+	128
5.4.6. Activité des échangeurs Na^+/H^+	129
5.4.6.1. Activateurs des échangeurs Na^+/H^+	129
5.4.6.2. Échangeurs Na^+/H^+ et les variations de l'osmolalité	131
5.5. Les canaux chlore	132
5.5.1. Généralités	132
6. INHIBITEURS DES TRANSPORTEURS DU TUBULE PROXIMAL	133
6.1. Bafilomycine A_1	133
6.1.1. Bafilomycine A_1 et H^+ -ATPase	133
6.1.2. Bafilomycine A_1 et Na^+ - K^+ et Ca^{2+} ATPases.....	134
6.2. Amiloride.....	135
6.2.1. Généralités	135
6.2.2. Amiloride et canaux Na^+	135
6.2.3. Amiloride et les échangeurs Na^+/H^+	137
6.2.4. Amiloride et les échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$	140
6.2.5. Amiloride et la Na^+ - K^+ ATPase.....	140
6.3. Inhibiteurs des canaux chlore	140
6.3.1. DIDS	140
6.3.1.1. Effets cellulaires du DIDS.....	142
6.3.2. SITS	143
6.3.3. DNDS et NPPB	144
6.3.3.1. Effets cellulaires du DNDS et du NPPB	145

PUBLICATIONS..... 146

ARTICLE I. ALBUMIN TRANSPORT BY ISOLATED RENAL TUBULES.... 147

Summary.....	149
Introduction	150
Methods.....	151
-Reagents.....	151
-Preparation of tubule suspensions from dog kidney..	151
-Preparation of albumin:Evans Blue complexes.....	151
-Measurement of albumin transport by intact proximal tubules.....	152
-Electron microscopy and immunolabeling.....	153
-Statistics	153
Results.....	154
-Evans Blue:albumin complexes.....	154
-Binding of EB during incubation of cortical tubules with EB without albumin.....	154
-Accumulation of EB during incubation of cortical tubules with EB:albumin complexes.....	155
-Modulation of albumin transport by variation of charges and by osmolarity and temperature.....	156
-Action of various inhibitors on albumin transport.....	156
-Electron microscopy....	157
-Transport in TAL and PCD tubules....	157
Discussion....	158
Acknowledgments...	163

Bibliography	164
Figure captions.....	167
Figures.....	169
Table 1.....	180

**ARTICLE 2. REGULATION OF ALBUMIN ENDOCYTTIC REABSORPTION
BY ENDOSOMAL PROTON TRANSPORT..... 181**

Summary.....	183
Introduction..	184
Methods.....	185
-Reagents.....	185
-Preparation of tubule suspensions from dog kidney..	185
-Preparation of Evans Blue:albumin complexes.....	185
-Measurement of albumin transport by proximal tubules in suspension.....	186
-Measurement of respiration of proximal tubules.....	187
-Determination of protein content.....	187
-Statistics.....	187
Results.....	188
-Measurement of albumin transport.....	188
-Effect of osmolarity on albumin transport.....	188
-Effect of bafilomycin on albumin transport....	189
-Effect of amiloride on albumin transport.....	189
-Effect of NH ₄ Cl on albumin transport	189

-Effect of chloride channels inhibitors on albumin transport..	190
-ATP turnover....	190
Discussion....	192
Acknowledgments.....	199
Bibliography	200
Figure captions.....	203
Figures.....	204
Tables.....	208
DISCUSSION GÉNÉRALE	210
1. Rappel.....	210
1.1. Filtration de l'albumine.....	211
1.2. Réabsorption de l'albumine	211
1.3. Catabolisme de l'albumine.....	213
1.4. Transport de l'albumine	215
2. Résultats	216
2.1. Le transport d'albumine est sensible à la variation de ses charges.....	216
2.2. Le transport d'albumine est sensible à l'osmolarité.	218
2.3. Le transport d'albumine est sensible à la variation des pH endosomal et lysosomal	219
3. Projections	221
BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE..	225

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 2

Tableau 2-I Poids moléculaire de l'albumine humaine avant et après addition de BE
déterminé par ultracentrifugation103

Tableau 2-II Activité moléculaire de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase dans les tubules contournés
proximaux microdisséqués de lapin.....118

Article 1

Table 1 Effect of different substances and anoxia treatment on the transport of
EB:Alb complexes by proximal tubules.....180

Article 2

Table 1 Initial and late rate of apparent albumin transport.....208

Table 2 Effect of sucrose, NH_4Cl and DIDS on the respiration of proximal tubules.....209

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

Figure 1-1	Modèle de l'albumine sérique selon les propriétés physiques..	1
Figure 1-2	Structure de l' albumine sérique bovine.....	2
Figure 1-3	Illustration d'un domaine typique de l'albumine sérique humaine.....	4
Figure 1-4	Hélices, ses sous-domaines et domaines de l'albumine sérique.....5	
Figure 1-5	Organisation structurale de l'albumine sérique bovine.....	7
Figure 1-6	Localisation des régions et sites de liaison de l'albumine humaine..... 11	
Figure 1-7	Métabolisme normal de l'albumine.....	19
Figure 1-8	Interrelation entre la préproalbumine, la proalbumine et l'albumine.....24	
Figure 1-9	Synthèse et sécrétion de l'albumine à partir du foie.....	25

Chapitre 2

Figure 2-1	Graphique montrant le rapport des concentrations filtrat /plasma (Θ) variant en fonction de la taille moléculaire pour le dextran neutre (D), le dextran sulfate (DS) et le diéthylaminoéthyl dextran (DEAE).....37	
Figure 2-2	Clairances fractionnelles du dextran neutre (D) en fonction du rayon d'Einstein-Stokes.....	39
Figure 2-3	Représentation schématique de la paroi capillaire glomérulaire.....43	
Figure 2-4	Représentation schématique du néphron.....	52
Figure 2-5	Modèle explicatif de la cinétique d'absorption de l'albumine dans le tubule proximal isolé perfusé de lapin.....	54
Figure 2-6	Cinétique d'absorption de l'albumine dans des tubules contournés proximaux isolés de lapin.....	58

Figure 2-7	Effets des albumines anionique (ALB ⁻) et cationique (ALB ⁺) sur la réabsorption dans les tubules contournés proximaux.....	60
Figure 2-8	Effets de la charge nette sur l'absorption tubulaire d'albumine dans les tubules contournés proximaux.....	61
Figure 2-9	Systèmes de transport des protons dans les cellules du tubule proximal.....	65
Figure 2-10	Fonctions de l'acidification vacuolaire dans les cellules animales.....	66
Figure 2-11	Ciblage d'enzymes vers les lysosomes.....	80
Figure 2-12	Capture initiale du FITC-albumine dépendante de l'osmolarité extracellulaire.....	85
Figure 2-13	Action de l'hyperosmolalité combinée à la cytochalasine B.....	86
Figure 2-14	Structure du Bleu Evans.....	101
Figure 2-15	Courbes des variations du Bleu Evans intra- et extracellulaires.....	105
Figure 2-16	Liaison de différentes quantités de l'albumine sérique humaine purifiée à du Bleu Evans.....	107
Figure 2-17	Devenir du Bleu Evans.....	108
Figure 2-18	Mécanismes de transport du tubule proximal.....	114
Figure 2-19	Structure de la Na ⁺ -K ⁺ ATPase.....	116
Figure 2-20	Cycle de réaction E ₁ -E ₂ de la Na ⁺ -K ⁺ ATPase.....	117
Figure 2-21	Structure d'une H ⁺ -ATPase présente dans les vésicules tapissées de clathrine.....	120
Figure 2-22	Structure de deux ATPases cationiques: F ₁ F ₀ -ATPase et H ⁺ -ATPase vacuolaire.....	122
Figure 2-23	Structure de l'échangeur Na ⁺ -H ⁺	125
Figure 2-24	Effet du pH interne sur la vitesse d'entrée du Na ⁺	127
Figure 2-25	Inhibition des isoformes NHE-1, NHE-2 et NHE-3 par l'amiloride.....	137
Figure 2-26	Modification des sites de l'échangeur Na ⁺ -H ⁺	139

Article 1

Figure 1	Binding of free Evans Blue to cortical tubules.....	169
Figure 2	Binding or transport of Evans Blue in cortical tubules incubated in absence or presence of 0.0125 mg/mL free EB or in presence of EB:albumin complexes.....	170
Figure 3	Transport of Evans Blue:albumin complexes as a function of tubular mass.....	171
Figure 4	Transport of Evans Blue:albumin complexes in cortical tubules incubated in presence of 6.25, 12.5 and 25 mg/mL albumin with a 7:1 EB:Alb molar ratio.....	172
Figure 5	Transport of Evans Blue:albumin complexes in cortical tubules as a function of albumin concentration.....	173
Figure 6	Transport of Evans Blue:albumin complexes and free EB in cortical tubules incubated in presence of white and blue albumin (with a 7:1 EB:Alb molar ratio).....	174
Figure 7	Transport of Evans Blue:albumin complexes in cortical tubules incubated with 12.5 mg/mL albumin having 1= 7:1, 2= 35:1 and 3= 70:1 EB:Alb molar ratio.....	175
Figure 8	Transport of Evans Blue:albumin complexes in cortical tubules as a function of osmolarity (with 7:1 EB:Alb).....	176
Figure 9	Transport of Evans Blue:albumin complexes in cortical tubules as a function of temperature (37, 22 and 4 C°) (with 7:1 EB:Alb).....	177
Figure 10	Immunogold electron-microscopic visualization of albumin uptake by receptor-mediated endocytosis in dog proximal tubules in suspension..	178
Figure 11	Transport of Evans Blue:albumin complexes in cortical tubules, thick ascending limbs and papillary collecting ducts (with 7:1 EB:Alb).....	179

Article 2

Figure 1	Inhibition of Evans Blue:albumin complexes uptake in cortical tubules by hyperosmolarity.....	204
Figure 2	Transport of Evans Blue:albumin complexes in cortical tubules as a function of osmolarity.....	205
Figure 3	Transport of Evans Blue:albumin complexes in cortical tubules incubated 12.5 mg/mL albumin with a 7:1 EB:alb molar ratio.....	206
Figure 4	Effect of chloride channels inhibitors on the transport of EB:albumin complexes by cortical tubules in suspension.....	207

Discussion

Figure 1	Systèmes de transport de protons dans les endosomes.....	212
----------	--	-----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

$\Delta m Na^+$	gradient électrochimique du Na^+
a.a.	acide aminé
Ac	anticorps
AER	vitesse d'excrétion de l'albumine
Ag	antigène
AGE	produit de glycosylation avancée
AH	anse de Henle
AMP	acétate-13 myristate-12 phorbol
AMPC	adénosine 3', 5' monophosphate cyclique
AP-1	lignée de cellules ovariennes de hamsters chinois transfectées
Arg	arginine
ASB	albumine sérique bovine
ASH	albumine sérique humaine
ATP	adénosine triphosphate
ATPase	enzyme qui hydrolyse l'ATP
ATPase de type V	ATPase vacuolaire
ATPase de type P	ATPase nécessitant une phosphorylation
BAF	bafilomycine
BCAA	acide aminé à chaînes ramifiées
BE	Bleu Evans
CBG	globuline se liant à un corticostéroïde
CF	clairance fractionnelle
CFTR	régulateur de la conductance transmembranaire de la fibrose kystique
CURL	compartiment où s'effectue le découplage du récepteur et de son

	ligand
DAMP	3-(2, 4-dinitroanilino)-3'-amino-N-méthylpropylamine
DEAE	diéthylaminoéthyl
DIDS	4,4'-diisothiocyanatostilbène-2,2' acide disulfonique
dL	décilitre
DNDS	4,4'- dinitrostilbène-2,2' acide disulfonique
DP transépithéliale	différence de potentiel transépithéliale
dXTP	désoxyribonucléotide triphosphate
EDTA	éthylènediaminetétraacétate
EGF	facteur de croissance endothélial
EIPA	éthylisopropyl amiloride
FCR	vitesse de catabolisme fractionnel
FTTC	fluorescéine iso-thiocyanate
g/kg P.C.	g/kg de poids corporel
g-GT	gamma-glutamyl transférase
GAG	glycosaminoglycan
GFR	vitesse de filtration glomérulaire
GH:	hormone de croissance
G ₀ /G ₁	étapes du cycle cellulaire
GSC	coefficient de tamisage glomérulaire
HDL:	lipoprotéine avec une densité élevée
HDM	hexadiméthrine
IC ₅₀	50% de la valeur du courant de court-circuit
IECA	inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
IL-1	interleukine-1
Isc	courant de court-circuit
JTC	lignée de cellules rénales de singe
Jv	réabsorption du fluide

kDa	kilodaltons
Kf	coefficient d'ultrafiltration
Ki	constante d'inhibition
Km	constante de Michaelis-Menten
L	litre
LAP	lignée de cellules fibroblastiques de souris
LDL	lipoprotéine avec une basse densité
Lys	lysine
LLC-PK1	lignée de cellules rénales proximales de porc
LMWP	protéine de faible poids moléculaire
LT4	leucotriène 4
MBB	membrane de bordure en brosse
MBG	membrane basale glomérulaire
MIA	N-5 méthylisobutylamiloride
mL	millilitre
mL	microlitre
NAG	N-acétyl-b-D-glucosaminidase
N/Km	index d'efficacité de l'endocytose d'adsorption (capacité de liaison/constante apparente de dissociation)
NH ₄ Cl	chlorure d'ammonium
NHE	isoforme de l'échangeur Na ⁺ H ⁺
nL	nanolitre
NPPB	5-nitro-2(3-phényl propylamino) acide benzoïque
OK	lignées cellulaires rénales d'opossum
ORCC	canal chlore avec un courant rectificatif sortant
P	perméabilité
PAH	acide p-amino hippurique
pc	pression hydrostatique capillaire

pc	pression oncotique capillaire
PCR	Réaction en Chaîne grâce à la Polymérase
PCG	paroi capillaire glomérulaire
PCO	pression colloïdale osmotique
PG	prostaglandine
pI	point isoélectrique
pi	pression hydrostatique interstitielle
pi	pression oncotique interstitielle
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase dépendant du calcium et des phospholipides
PM	poids moléculaire
PMSF	phénylméthylsulfonyl fluoride
PS-120	lignée de cellules fibroblastiques transfectées (sans échangeur Na ⁺ -H ⁺ endogènes)
PTH	hormone parathyroïdienne
PVP	polyvinylpyrrolidone
RB	rouge brillant
RE	réticulum endoplasmique
REG	réticulum endoplasmique granulaire
REL	réticulum endoplasmique lisse
RIA	essai radioimmunologique
RKPC-2	un virus (SV-40) transfecté dans une lignée de cellules originaires du S2 de TP de lapin
SDS-PAGE	gel d'électrophorèse avec sodium dodécyl sulfate-polyacrylamide
SITS	4-acétamido-4'-isothiocyanatostilbène-2,2' acide disulfonique
T1/2	temps de demi-vie
T4	thyroxine
TCA	acide trichloroacétique

TCD	tubule contourné distal
TCP	tubule contourné proximal
TD	tubule distal
TEA	tétraéthylammonium
Tm:	transport maximal
TNF	facteur de nécrose tumoral
TP	tubule proximal
Trp	tryptophane
TXA ₂	thromboxane A ₂
VD	volume de distribution
VLDL	lipoprotéine à très basse densité
V _{max}	vitesse maximale
VMBB	vésicule de membrane de bordure en brosse

A mon meilleur ami, Thor.

*Si tu peux voir détruit l'ouvrage de ta vie
Et sans dire un seul mot te mettre à rebâtir,*

.....

*Si tu sais méditer, observer et connaître,
Sans jamais devenir sceptique ou destructeur,
Rêver, mais sans laisser ton rêve être ton maître,
Penser, sans n'être qu'un penseur.....*

Tu seras un Homme, mon fils.

R. Kipling.

REMERCIEMENTS

Je remercie le docteur Vinay de m'avoir donné la chance de pouvoir acquérir l'expérience et la débrouillardise nécessaires à l'élaboration d'un mémoire. Bien que la plupart du temps il n'ait pas été disponible, il a toujours essayé de s'occuper le plus possible de mes travaux et je lui en suis reconnaissante. Je remercie également Vladimir pour toute l'aide qu'il m'a apportée surtout dans la finalisation de mes articles et de mon mémoire. Tous mes remerciements vont à Jacques et à Gisèle qui ont toujours été présents lorsque j'avais des difficultés. Je remercie également Marie-Josée Sasseville, étudiante en doctorat, de l'aide et de ses conseils lors de l'utilisation du microscope de fluorescence.

Je remercie finalement les membres du jury qui ont accepté d'investir leur temps déjà si précieux dans la lecture de mon mémoire de maîtrise.

Un gros merci pour tous ceux qui, de près ou de loin, par leur assistance, leurs encouragements, leur gentillesse m'ont aidée à figoler ce mémoire.

INTRODUCTION

CHAPITRE I. GÉNÉRALITÉS SUR L'ALBUMINE

1. STRUCTURE DE L'ALBUMINE

Généralités

L'albumine est une protéine monocaténaire de 585 acides aminés (a.a.) dont le poids moléculaire (P.M.) est de 66 458 (Figure 1-2) (133). Son axe majeur s'élève à 140-150 Å et son axe mineur, à ± 40 Å (Figure 1-1) (96). Elle présente une forme elliptique (Figure 1-1) (96).

FIGURE 1-1. Modèle de l'albumine sérique selon ses propriétés physiques (96).

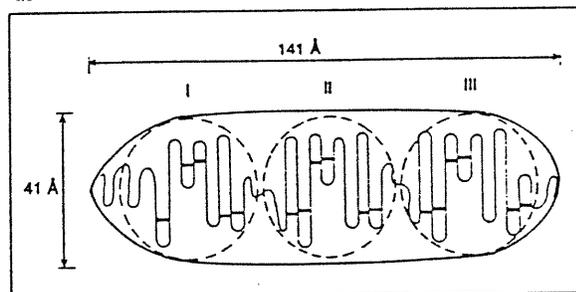


Fig. 2. Model of serum albumin based on physical properties. According to electric birefringence measurements, the protein behaves like an ellipsoid as shown by the full line in the figure. The values given for the axes are those published for bovine serum albumin (Wright & Thompson, 1975). The broken circles show a subdivision of the protein into three domains (I, II, and III), and the horizontal bars within the polypeptide chain represent the 17 disulfide bridges. The N-terminal end of the protein is at the left. The figure is a modification of that given by Peters (1985).

Sa constante de diffusion ($D_{20,w}$, $\times 10^7$) équivaut à 6.1 tandis que son absorbance optique (279 nm, 1 g/L) vaut 0.531 (129).

L'albumine se comporte comme un acide faible et participe à l'équilibre chimique acide-basique dans le plasma (55). Dans le sérum humain normal, selon Van

Leeuwen, avec un rapport a/g (albumine/globuline) normal, il en découle une charge négative de 0.242 mEq/g de protéines sériques totales à pH=7.4 (55). Donc, avec une valeur de protéines totales égalisant 6.8 mg/dL et un rapport a/g=1.5, les charges électriques négatives qu'elles affichent s'élèvent à 12.2 mEq/L (55). Selon Figge, de toutes les protéines sériques, l'albumine est la seule molécule dont les charges négatives peuvent varier significativement selon l'équilibre acido-basique existant dans le sérum (55). La contribution des globulines et d'autres protéines présentes dans le sérum est négligeable pour des valeurs normales du rapport a/g (55).

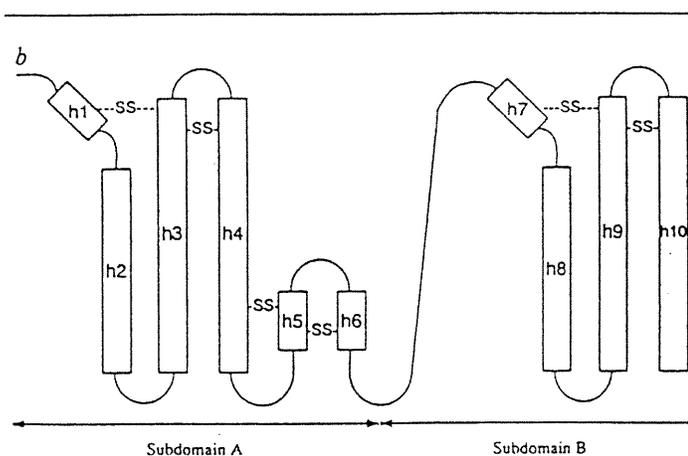
1.1. Structure primaire

La chaîne contient des a.a. chargés négativement: 23 Arg (96), 36 Asp (96), 35 Cys (96), 61 Glu (Figure 1-2) (129). La molécule possède aussi 59 lysines (96) porteuses de charges positives qui sont impliquées dans le phénomène de la glycation. On retrouve un seul tryptophane (Trp) (en position 214 (96)) et six méthionines (Figure 1-2) (96). La charge totale à pH=7 repose sur les 185 radicaux positifs ou négatifs portés par la molécule (129). Le point iso-ionique de la sérum albumine humaine désionisée s'élève à 5.16 (96). En général, son pI varie entre 4.8 et 5.6 (133). La charge nette à pH physiologique (pH=7) est de -15 (129) à -17 (96). Ces charges nettes sont réparties de façon inégale: pour le domaine I, elle vaut -9; pour le domaine II, -8 et pour le domaine III, +2 à pH7. La molécule n'est donc pas uniformément chargée sur toute sa longueur (129). La partie NH₂terminale est hautement négative alors que la partie COOH terminale est presque neutre (129).

1.2. Structures secondaire et tertiaire

L'albumine possède 35 cystéines qui jouent un rôle important dans la conformation et la stabilité (96) de la structure tertiaire de la molécule en créant 17 ponts sulfurés. La Cys 34 ne forme pas de pont sulfuré: son groupement sulfhydryl est partiellement bloqué par liaison covalente avec des ligands tels que le glutathion et la cystéine (96). La forme de l'albumine est très asymétrique et ressemble à un triangle équilatéral. Elle possède trois domaines structurellement homologues I, II et III qui se répètent dans la molécule (figure 1-3) (76).

FIGURE 1-3 Illustration d'un domaine typique de l'albumine sérique (76).



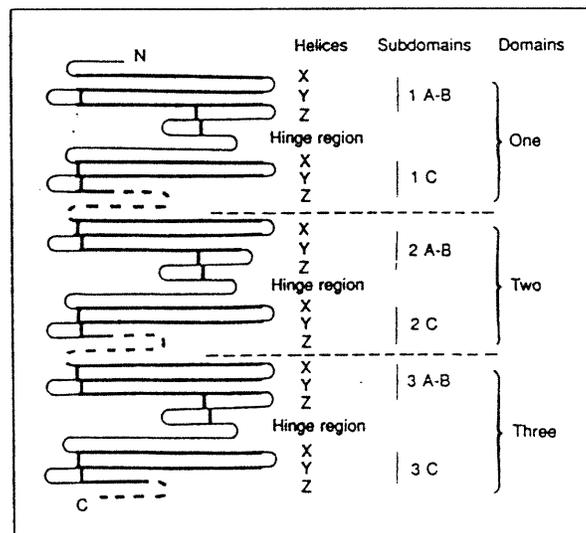
The principal portion of each subdomain is formed by one of the six larger disulphide double loops in the amino acid sequence, often referred to in the literature as loops 1, 3, 4, 6, 7 and 9 or 1A, 1C, 2A, 2C, 3A and 3C²². Three of these loops, 1, 4 and 7 are each supplemented by an additional, but smaller disulphide double loop (2, 5 and 8, respectively). Consequently the combinations of loops 1 and 2, 4 and 5, 7 and 8 represent the three A subdomains (IA, IIA and IIIA) and loops 3, 6 and 9 the B subdomains (IB, IIB and IIIB). The two largest helices in the structure occur at the interdomain connections (IB-IIA and IIB-IIIA) and represent the merged C-terminal and N-terminal helices of both domains. Thus the total number of helices is 28 rather than 30.

Ces domaines ont été découverts par polarisation de fluorescence, dégradation à la pepsine et diffraction des rayons-X (96). Ils contiennent chacun trois doubles boucles

(=hélices) qui sont anti-parallèles entre elles (96) et se subdivisent chacun en deux sous-domaines A et B (76). Ces doubles boucles sont maintenues ensemble par une paire de ponts sulfurés sauf dans le domaine I où il y a seulement un lien disulfuré (96). L'hélice du milieu est placée sous les deux autres formant une structure en forme de creux appelée "sous-domaine" (96). Deux sous-domaines reliés par une région charnière forment un domaine (96).

Un domaine est constitué de six hélices formant une cavité cylindrique avec deux ouvertures (96). L'arrangement de ces six sous-domaines (Ia; Ib; IIa; IIb; IIIa; IIIb) est quaternaire (31) et hélicoïdal (76). Il y a dix hélices principales dans chaque domaine (76). Le sous-domaine A se compose de deux courtes hélices anti-parallèles -h₅ et h₆ liées ensemble par deux ponts sulfurés. Le sous-domaine B montre un motif hélicoïdal avec la partie du NH₂-terminal du segment polypeptidique linéaire (76). Les sous-domaines A et B des trois régions I, II, III possèdent un motif commun incluant les hélices h₁ à h₄ pour le sous-domaine A et les hélices h₇ à h₁₀ pour le sous-domaine B. Un pont sulfuré relie h₁ et h₃ sauf dans le sous-domaine IA (76).

FIGURE 1-4 Hélices, domaines et sous-domaines de l'albumine sérique (96).



Selon un autre modèle, chaque domaine comprendrait trois sous-domaines (A, B, C) qui seraient constitués de trois hélices α formées chacune d'une vingtaine d'a.a. (26). D'autres auteurs ont écrit que les deux sous-domaines A et B formeraient une seule sous-unité de telle façon qu'il y aurait deux sous-domaines A-B et C (Figures 1-4 et 1-5) (96).

Par contre, les connections intra-domaniales sont hélicoïdales du COOH-terminal des hélices de IB et IIB ($h_{10}(I)-h_1(II)$) au NH_2 -terminal des hélices de IIA et IIIA ($h_{10}(II)-h_1(III)$) (76). La plus grande hélice de 31 a.a. dans la structure ($h_{10}(I)-h_1(II)$) constitue la connection entre IB et IIA (76). La plupart des a.a. situés le long des grandes boucles et dans les connections inter-domaniales se trouvent sous forme d'hélice α alors que les régions charnières intra-domaniales sont non-hélicoïdales (133).

Les connections intra-domaniales entre les sous-domaines IA-IB; IIA-IIB; IIIA-IIIB consistent en segments polypeptidiques s'étendant de la Lys 106 au Glu 119 dans le domaine I, du Glu 292 à la Val 315 dans le domaine II et du Glu 492 à l' Ala 511 dans le domaine III (76). La chaîne peptidique de l'albumine humaine est repliée à 67 % sous forme hélicoïdale, les 33 % restant étant repliés sous forme de tours ou de segments polypeptidiques linéaires (76).

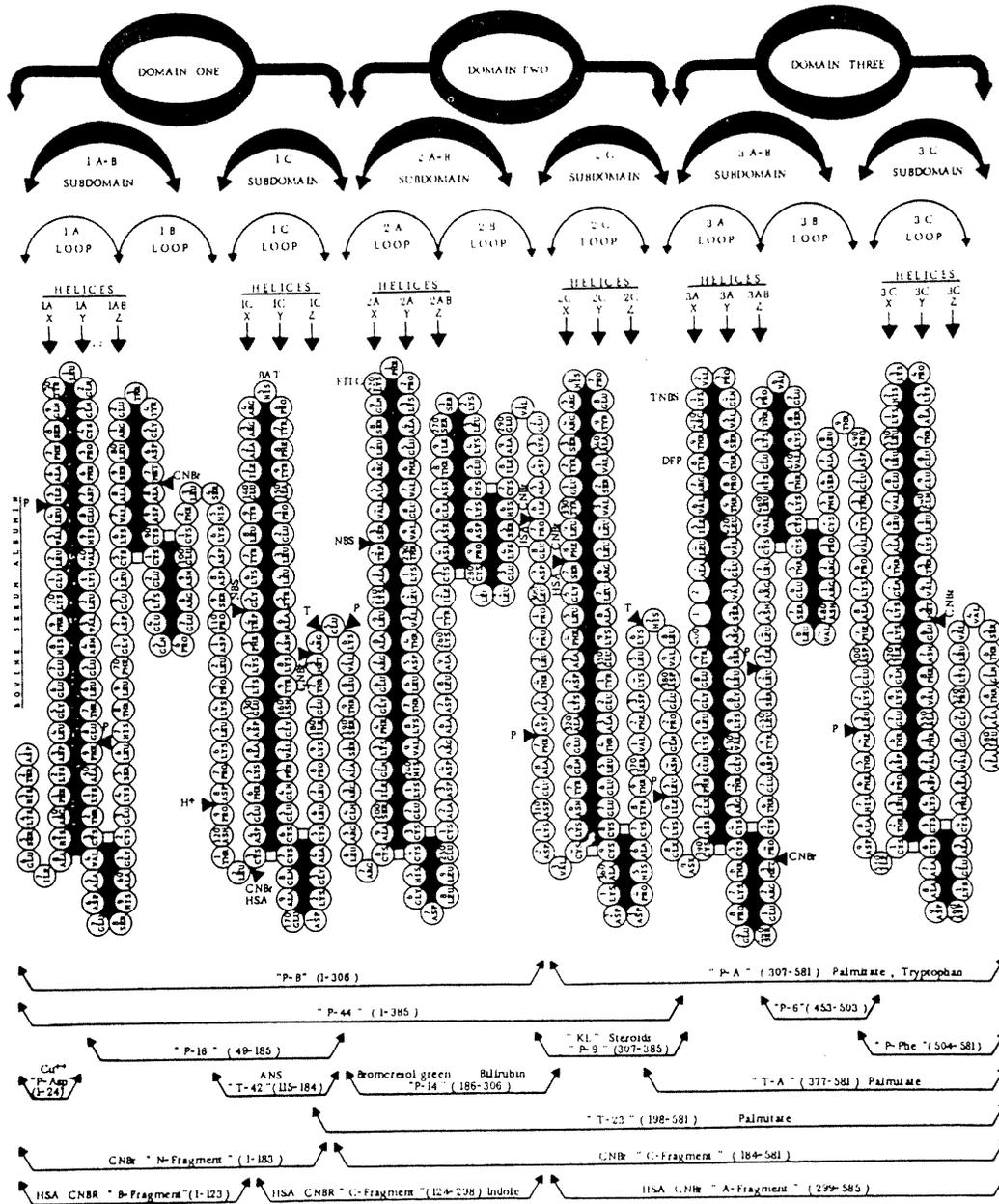
FIGURE 1-5 Organisation structurale de l'albumine sérique (26).

Fig. 6. Structural organization of serum albumin. Various repeat units or structural features are indicated above the sequence. The helices are hypothetical and are proposed to start at the Cys and run up for about 20 residues. The CZ helices (175-195, 367-387 and 564-581) are not proposed to break in the middle as suggested by the figure. Connecting segments (not designated in the figure) are numbered by lower-case letters of the loops that they connect: (1-7) = la; (63-74) = lab; (102-122) = lbc; (176-197) = lca; etc. At the bottom of the figure the locations and binding properties are given for fragments of BSA (except the HSA-CNBr fragments on the bottom line). The references for the fragments are as follows: "P-B" and "P-A" (41, 43, 45); "P-44", "P-6", "P-16", "P-9", "P-Phe" (41, 43, 45); "P-14", "T-42", "T-A", "T-23" (42, 43, 45); "P-Asp" (28); "N- and C-Fragment" (6); HSA-CNBr Fragments A, B and C (40, 16); and "KL" (52). Points of specific cleavage by pepsin (P), trypsin (T), cyanogen bromide (CNBr), N-bromosuccinimid (NBS) or acid (H+) are located in the figure by the filled triangles (▲). BAT, FITC, TNBS and DFP denote residues specifically modified by these reagents.

2. LIGANDS ET SITES DE LIAISON SUR L'ALBUMINE

Les sous-domaines IIA et IIIA sont majoritairement responsables de la liaison de l'albumine à différents ligands ainsi qu'à de nombreux xénobiotiques. Le sous-domaine IA ne se lie pas à des ligands, sa structure est donc différente de celle des sous-domaines IIA et IIIA (76). Le sous-domaine IIA possède un seul site de liaison pour la warfarine (76). Entre les sous-domaines IIA et IIIA, on retrouve des sites de liaison pour l'aspirine et des analogues iodés (76). Le sous-domaine IIIA lie préférentiellement la digitoxine, l'ilréprofen, le Trp (76).

La Lys 199, le Trp 214, la Tyr 411 sont localisés stratégiquement dans les poches hydrophobes de IIA ou IIIA et sont impliqués dans ces liaisons (76). Le Trp 214 joue un rôle important structural dans la formation du site de liaison de IIA en limitant l'accessibilité du solvant et participe à une interaction hydrophobe entre les interfaces de IIA et IIIA (76).

La (ou les) partie(s) de l'albumine qui interagit (ssent) le plus fortement avec un ligand constitue(nt) le premier site de liaison. Si un autre ligand à forte affinité est présent, il pourrait réagir avec les mêmes parties de la protéine ou avec des parties voisines de telle façon que la co-liaison des deux ligands ne puisse plus s'effectuer (96). Sur l'albumine, il y a un ou deux sites de liaison à haute affinité (sites primaires) et un nombre variable de sites de moindre affinité (sites secondaires) pour différentes molécules. Généralement, l'albumine se lie non-covalentiellement aux ions et aux petites molécules.

2.1. Le site I

L'albumine lie les acides gras à longue chaîne (C16-C18) (transportés dans le plasma grâce à l'albumine) sur un site situé sur la boucle 7 du domaine III (Figure 1-6). L'affinité pour les deuxième et troisième sites de l'albumine augmente avec la longueur de

la chaîne de l'acide gras (129). Le nombre maximal d'acides gras qui peuvent se lier à l'albumine in vitro s'élève à six (129). Cependant, en moyenne, un à deux acides gras se lient à une molécule d'albumine (129).

Les deux premiers acides gras qui se lient à l'albumine paraissent être les plus importants pour le transport physiologique et la stabilité structurale de cette molécule. Le site primaire pour les acides gras se situerait dans le milieu du domaine III (377 à 582). Le site secondaire se situerait entre les domaines II et III et serait associé intimement à la boucle 6. Cette liaison du domaine II au domaine III stabiliserait la configuration de l'albumine (129). Un site tertiaire est également disponible et provient d'un changement de conformation des boucles 2 et 3 qui se replient de telle façon qu'elles peuvent lier un acide gras (129). Le site quaternaire est situé près de la boucle 4 (129). Le fragment T-A du domaine III contiendrait un site à grande affinité pour le palmitate (26).

On sépare les acides gras en deux catégories: les saturés (acide octanoïque, acide décanoïque, acide dodécanoïque, acide myristique, acide palmitique, acide stéarique) et des insaturés à 18 carbones (acide oléïque, acide linoléïque, acide linoléinique). On étudie la liaison des acides gras en observant leur influence sur l'affinité des sites de liaison du rouge phénol.

Les sites primaires de liaison pour l'octanoate et le décanoate (groupe 1) (site II), qui sont des acides gras possédant moins de dix carbones, doivent être différents de ceux du myristate, du palmitate, du stéarate (plus de dix carbones) (groupe 2) ou de ceux des acides gras insaturés à longue chaîne de 18 carbones formant un troisième groupe (96).

Le palmitate peut se lier fortement aux Lys 349 et 473 de l'albumine sérique qui pourraient participer ainsi à la formation du site à grande affinité de liaison dans la région 1, mais ceci n'est pas compatible avec le modèle protéique de Brown (96).

Ockner suggère que la constante de dissociation du complexe récepteur-albumine est tellement élevée ($10-100 \text{ sec}^{-1}$) que l'oléate ($K=0.045 \text{ sec}^{-1}$) quitterait rarement l'albumine avant que le complexe quitte le récepteur cellulaire qui le reconnaît

(129). Pour accélérer la dissociation du ligand de l'albumine, la liaison albumine-récepteur devrait provoquer un changement conformationnel de l'albumine (129).

La captation ou la libération d'acides gras par les hépatocytes a été bien étudié. Le sinusoiïde hépatique qui occupe 10 % du volume hépatique communique irrégulièrement avec l'espace de Disse. L'espace de Disse contient du plasma non circulant qui entre en contact avec les microvillosités de l'hépatocyte (129). Lors de chaque passage à travers le sinusoiïde, 25 % de l'albumine plasmatique prend en charge 25 % des ligands qui atteignent ses microvillosités (129). Cette fraction plasmatique doit entrer et sortir des espaces de Disse par les pores endothéliaux pour décharger ses ligands (129).

2.2. Le site II

L'albumine lie la thyroxine et le Trp, les acides gras à courte chaîne (site secondaire) et les stéroïdes (Figure 1-6). Ce site est localisé au sommet de la boucle 3 du domaine I. Les a.a.: Arg 144-145, His 146, Tyr 148 et 150 sont spécialement mis en jeu dans ces phénomènes de liaison. Des a.a. chargés positivement, les Lys 190 et 195, font partie de ce site (96). La Tyr et le Trp partagent le même site de liaison mais avec une différence d'affinité (129). Le Trp et la thyroxine se lient à un site secondaire dans le domaine III (129). Le fragment 182-585 lie le Trp et le diazépam compétitivement (129). La Lys 412 est impliquée dans la liaison à la thyroxine (129). Le site II pourra lier aussi bien des acides gras à courte chaîne (moins de dix carbones (96)) que des anions incluant les diazépines, le chlorfibrate, l'acide flufénamique, le naproxen qui appartiennent au groupe II de Sudlow (129).

L'albumine possède une région commune de liaison à laquelle l'octanoate, le L-Trp, le D-Trp, le chlorazépat, la L-thyroxine, le p-iodobenzoate et peut-être le Cl⁻ se lient avec une forte affinité (96).

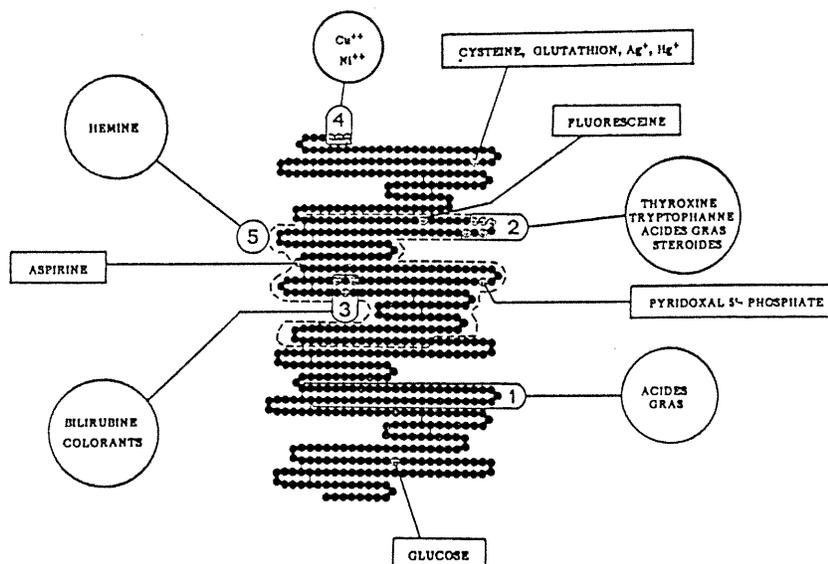
FIGURE 1-6 Localisation des régions et sites de liaison de l'albumine (133).

FIG. 3. —Localisation des régions et des sites de liaison de l'albumine humaine.

1, 2, 3, 4 et 5: régions de liaisons non covalentes.

0: sites de liaisons covalentes.

Les ligands non covalents sont cerclés.

Les ligands covalents sont encadrés.

Le D-Trp se lie à l'albumine avec une constante de liaison 100 fois moins grande que celle du L-Trp (96).

2.3. Le site III

L'albumine lie la bilirubine dans le domaine II (76) (comprend les boucles 4, 5, 6, i.e. les a.a.198 à 389) et différents colorants (Bleu Evans, Fluorescéine, Vert de bromocrésol,...) à un site qui implique surtout les résidus: Lys 240, His 242, Arg 257 contigus dans le repliement moléculaire (Figure 1-6).

La bilirubine non-conjuguée se lie à l'albumine à un site de liaison à haute affinité et à un ou deux sites de moindre affinité. L'addition de plus de quatre moles d'acides gras par mole d'albumine native ne cause pas une libération significative de la bilirubine de son premier site de liaison (96). Le site à haute affinité de liaison de la

bilirubine se situe au niveau de la boucle 4 (a.a. 198-251) (96). Cette région de liaison semble être aussi le site à haute affinité de liaison du rouge phénol (96). Il y a une inhibition compétitive pour le site primaire de liaison sur l'albumine entre la bilirubine et la vasoflavine, le vert d'indocyanine, l'iodypamide, le vert de bromocrésol, le rouge phénol et l'acide flavaspidique mais pas avec le rose bengale ni le sulfobromophthaléine (96). Le fragment P₁₄ lierait la bilirubine et le vert de bromocrésol (sous-domaine IIA-B). Le FITC (Fluorescéine Iso-Thio-Cyanate) et le vert de bromocrésol ont une structure similaire, ce qui pourrait impliquer leur liaison au même site (26). Les sites de liaison de la bilirubine se trouvent dans les fragments contenant les régions 198 à 308, au niveau des a.a. (His, Arg, Lys, Tyr) qui avoisinent le site de haute affinité (129). Ce site de liaison est composé majoritairement d'a.a. basiques (Lys 240, Arg, His, Tyr) (96). La bilirubine interagit fortement avec les fragments P₄₄ (a.a. 1-386) et P₂₉ (a.a. 49-307) (96).

2.4. Le site IV

Le site IV lie des cations tels le nickel, le cuivre (au niveau de la boucle 1, du 1^o au 24^o a.a.) (Figure 1-6) (129). Le site à haute affinité pour le cuivre et le nickel se compose des trois premiers a.a.: Asp-Ala-His de la partie NH₂ terminale de l'albumine (96). Ici, l'His est l'a.a. le plus important parce que s'il est remplacé par un autre a.a. ou s'il est manquant, l'albumine est incapable de se lier à ces deux cations (96).

2.5. Le site V

Le site V lie l'hémine à l'intérieur de la séquence 124-298 située dans la partie NH₂ terminale de la molécule (Figure 1-6). La partie COOH terminale de l'albumine est importante pour la configuration spatiale du site de liaison de l'hémine (96).

Il pourrait exister une région de liaison à laquelle se lieraient l'acide salicylique, l'indométacine, le chlorpropamide, le tolbutamide, le sulfa-ethidole, le sulfathiazole et peut-être la warfarine avec une grande affinité (96).

A peu près 50 % du Ca^{+2} plasmatique se lie à l'albumine, dans la région NH_2 terminale et cette liaison n'est ni forte ni spécifique à l'albumine.

Retenons quelques sites particuliers de liaison covalentielle pour certaines substances :

la Cys 34 lie covalentiellement (96) la cystéine, le glutathion, l' Ag^+ , l' Hg^+ et la lysine-vasopressine, localisé entre l'hélice $h_2(I)$ et $h_3(I)$ (76).

La Tyr 138 lie la fluorescéine.

La Lys 199 lie l'acide acétylsalicylique.

La Lys 225 lie le pyridoxal-5P.

La Lys 525 lie le glucose.

La Tyr 411 peut être estérifiée par le p-nitrophénylacétate (76).

L'aspirine, la warfarine, les sulfonamides du groupe I de Sudlow partagent un site de liaison localisé sur la boucle 4 (Figure 1-6) (129).

Les acides biliaires se lient à l'albumine mais leur affinité diminue avec l'augmentation du nombre de groupements hydroxyles ou de leur conjugaison avec la glycine ou la taurine (129).

La liaison d'un ou deux ligands à chaque albumine peut provoquer des changements de conformation mis en évidence par une augmentation de la stabilité des protéines confrontées à la chaleur, à l'urée ou à l'hydrolyse par des enzymes protéolytiques (96). La testostérone, les androstérones et le calcium peuvent inhiber l'hydrolyse de l'albumine par la trypsine. La liaison de L-Trp ou de colorants diminue la digestion de l'albumine par la trypsine, la chymotrypsine, la pronase, la subtilisine et la papaïne (96).

Les mécanismes qui provoquent des changements de conformation de l'albumine nécessaires à la liaison du ligand sont les suivants:

1-Le ligand se lie préférentiellement à une forme isomérique de l'albumine pour former un complexe initial le plus stable (96). La liaison se produit lorsqu'il y a une modification de l'équilibre entre les nombreuses formes de l'albumine vers celle qui interagit le mieux avec le ligand (96). La liaison du ligand à la forme isomérique de la protéine qui a une haute affinité pour la bilirubine est suivie par l'isomérisation d'autres formes d'albumine en cette forme isomère stable à laquelle la bilirubine se lie (96). Il faut ici que l'isomérisation de l'albumine non liée soit plus rapide que le processus de liaison (96).

2-Les fluctuations conformationnelles de la protéine non liée ne jouent pas de rôle significatif dans le processus de liaison car les changements conformationnels de l'albumine arrivent après l'interaction avec le ligand. Initialement, s'effectue une association non-spécifique entre ligand et protéine selon un processus de deuxième ordre suivie de une à quatre étapes selon un processus de premier ordre avant que le complexe final ne soit formé (96). C'est le cas pour la bilirubine, l'hémine, la warfarine.

La liaison du cortisol à l'albumine est plus faible que sa liaison à la transcortine (ou CBG), transporteur spécifique de cette hormone (129). L'albumine est un réservoir de cortisol à haute capacité mais à faible spécificité (129).

La boucle 3 possède six Tyr et un Trp et une structure plus compacte que la boucle 6. La boucle 9 n'a pas de Tyr ni de Trp mais possède d'importants sites antigéniques (a une région active, F-1 du 545° au 573° a.a. et deux anticorps monoclonaux produits contre elle).

Il existe d'autres sites de liaison dont la localisation est imprécise et qui permettent une fixation covalente de lysines, PGH₂, TXA₂, phospholipides, lipides peroxylés et de plusieurs types de pénicilline par leur noyau β-lactame.

La liaison de plusieurs ligands requiert des sites intacts. Ainsi, la liaison de la bilirubine à l'albumine diminue avec la quantité de glucose incorporée dans la macromolécule (150) formant une glycation d'a.a. (surtout lysine) présents sur les sites.

Des changements de conformation de l'albumine peuvent faciliter la fixation ou la libération d'autres ligands. Ainsi, les sulfonamides peuvent se lier à l'albumine après avoir déplacé la bilirubine (133).

La fixation réversible de certains ligands stabilisent l'albumine: certains stéroïdes, Ca^{2+} , éthanol en petites quantités inhibent la protéolyse par la trypsine (133). La bilirubine, l'aspirine, la pénicilline, l'acide éthacrynique, les glycanes, le pyridoxal phosphate et certains disulfides se lient covalentiellement à l'albumine (129).

L'albumine transforme les PGH_2 en PGD_2 , les déshydrate et les inactive (129). Elle stabilise les autres éicosanoïdes tels que le thromboxane (TXA_2) et le leucotriène A_4 (LTA_4) (129).

3. DONNÉES PHYSIOLOGIQUES DE L'ALBUMINE

L'albumine possède un temps de demi-vie de 19-21 jours (133). La quantité totale d'albumine plasmatique humaine atteint ± 300 g (20). La concentration d'albumine plasmatique s'établit à 38-44 g/L (133). Le pool d'albumine échangeable est de 4.0-5.0 g/kg chez l'homme et de 3.5-4.5 g/kg chez la femme (133).

Un gramme d'albumine retient 15 mL d'eau dans le compartiment intravasculaire donc l'albumine totale retient 600 mL de liquide extracellulaire/L de plasma (133).

Six à dix % du pool d'albumine plasmatique est dégradé chaque jour (133).

L'excrétion normale d'albumine/jour est inférieure à 40 mg (20).

Chez le sujet normal, les valeurs de référence pour l'albumine glyquée représentent 0.9-2.6 % du total dans l'urine et 0.6-1.8 % dans le sérum tandis que chez le diabétique, 1.5-12.5 % dans l'urine et 1.4-10.9 % dans le sérum (145).

Le point isoélectrique (pI) de l'albumine native est de 4.7-4.9 et celui de l'albumine glyquée est de 3.0-4.2 (28); ce changement est une conséquence de la neutralisation de charges négatives par la fixation de molécules de glucose.

Chez le diabétique, pI pour l'albumine glyquée: 4.9-9.0 (28) alors que le pI de l'albumine varie entre 4.8 et 5.6 (133), cette différence de valeur peut s'expliquer par la glycation de l'albumine.

La masse totale d'albumine glyquée plasmatique est 3 g (20).

L'excrétion totale d'albumine glyquée est inférieure à 6 mg/jour (20).

3.1. Méthodes de mesure de la concentration d'albumine

La mesure de la concentration de l'albumine sérique varie en fonction de la méthode utilisée (157). Quatre techniques sont couramment employées:

1) le biuret ou la technique de Kjeldahl après extraction des globulines par précipitation saline;

2) mesure directe de l'albumine grâce à sa liaison à certains colorants tels que le vert de bromocrésol,

3) électrophorèse suivie d'une coloration des fractions protéiques,

4) immunochimie (immunotitration avec des anticorps spécifiques de la protéine placée sur le gel) (157).

3.2. Albumine dans l'espace plasmatique

L'évacuation plasmatique de l'albumine comporte une phase rapide (10 premières minutes) suivie d'une phase lente qui dure 10 à 60 minutes. Durant la première phase, s'effectue le passage du traceur (^{125}I -albumine) à travers les parois capillaires puis lors de la deuxième phase, il s'achemine vers l'espace interstitiel.

Chez les albuminuriques, l'augmentation de la perméabilité dans la seconde phase reflète les altérations de l'interstitium.

3.3. Albumine dans l'espace interstitiel

L'interstitium n'est pas un espace de distribution homogène pour l'albumine (103). L'albumine est exclue à 40-80 % de l'entièreté du compartiment extravasculaire (103). L'interstitium ne contenant pas de récepteurs volumiques, le rein ignore totalement l'oedème extravasculaire massif mais promouvra le rétablissement de l'homéostasie seulement si la rétention de liquide existe dans l'espace intravasculaire (103).

Parmi les déterminants du pool d'albumine interstitielle et de la microcirculation corticale rénale figurent: la taille et le métabolisme (ou "turn-over") du pool, la clairance unidirectionnelle de l'albumine à travers la paroi capillaire périrubulaire, le coefficient de Staverman de l'albumine vis-à-vis de la paroi capillaire périrubulaire et l'hétérogénéité de ce pool d'albumine interstitiel (130). Le volume de distribution de l'albumine interstitielle équivaut à la différence existant entre la distribution totale et intravasculaire de l'albumine marquée (130). Pour mesurer ces paramètres, on injecte de l'¹³¹I-albumine qui va se mélanger au pool d'albumine intravasculaire pendant trois ou quatre minutes (130). L'¹³¹I-albumine s'équilibre dans le plasma intravasculaire et peut ensuite pénétrer dans le pool interstitiel d'albumine (130). Les traceurs sont utilisés pour faciliter les mesures de l'activité spécifique des albumines plasmatique et lymphatique (130). Lorsqu'ils arrivent dans la lymphe, ils ont déjà traversé la paroi capillaire puis l'espace interstitiel (130). Le temps imparti par chaque traceur pour suivre le trajet plasma artériel-lymphe est variable et peut se calculer statistiquement par une probabilité de densité en fonction du temps de transit (130). La vitesse d'entrée de l'albumine dans l'interstitium des capillaires périrubulaires est supérieure à la vitesse à laquelle l'albumine est entraînée par le flux de convection du réabsorbat tubulaire dans les capillaires du rein (130). L'albumine qui entre dans l'espace interstitiel est enlevée par drainage lymphatique (130).

4. DISTRIBUTION ET MÉTABOLISME DE L'ALBUMINE

4.1. Définition

La distribution stable de l'albumine entre les liquides intra- et extracellulaires s'exprime de façon dynamique. Pour chaque compartiment, les échanges dépendent de la fraction (le pourcentage du pool d'albumine total) localisée dans le compartiment concerné. Cette fraction reflète les vitesses d'échange relatives entre les compartiments intra- et extravasculaire:

$$MIV.Kie = MEV.Kei \text{ (g/jour)}$$

où:

MIV et MEV = masses intra- et extravasculaires d'albumine (g)

et

Kie et Kei = fraction de MIV transférée dans MEV par jour et vice-versa (84).

Cette équation est une simplification importante parce que de nombreux pools distincts existent dans le compartiment extravasculaire (1. fluide interstitiel sous-cutané, 2. fluide des cavités séreuses, 3. fluide lymphatique dans les vaisseaux lymphatiques et nodules) avec des vitesses différentes d'échange de l'albumine avec le sang (84). Chez les enfants, jusqu'à trois mois, la valeur pour la distribution intravasculaire s'élève à 35 % du total et continue d'augmenter chez les enfants de plus de cinq ans pour atteindre 49 % (84). Chez les adultes, elle vaut 43 %, ce qui signifie que plus de la moitié du pool d'albumine total est de l'albumine extravasculaire (84,133).

Le taux de sérum albumine dépend de l'équilibre existant entre la synthèse et le catabolisme (i.e. dégradation endogène et perte extérieure), de la distribution entre les pools intra- et extravasculaires (157) et des volumes d'eau dans chaque compartiment.

La concentration de protéines sériques augmente pendant le jour (157). Durant la nuit, elle diminue (157). Ces deux changements reflètent le transfert de liquide sans albumine dans le compartiment extravasculaire par ultrafiltration d'orthostatisme à travers

les capillaires semi-perméables à l'albumine. La variation diurne de la protéine sérique totale atteint 10-13 g/L (157).

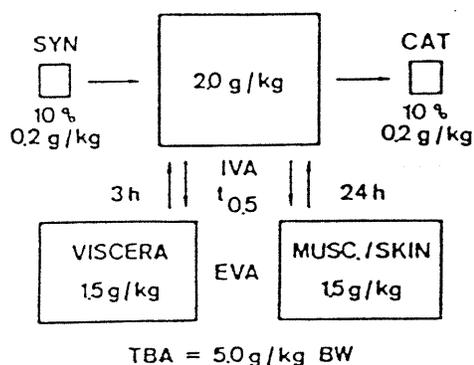
Par électrophorèse sur cellulose d'acétate, la concentration moyenne sérique normale d'albumine vaut 50.7 ± 3.1 g/L (107). La mesure moyenne de l'albumine sérique par le vert de bromocrésol s'élève à 43 g/L (107).

4.2. Valeurs normales

Des expériences effectuées avec des traceurs montrent que la quantité totale d'albumine (4.5-5 g/kg) se distribue entre des pools intravasculaire (IVA) contenant 40 % de l'albumine totale (TBA) (c'est-à-dire 1.8-2 g) et extravasculaire (EVA) en contenant 60 % (c'est-à-dire 2.7-3 g) (Figure 1-7) (103).

Le compartiment extravasculaire se subdivise en deux pools: les viscères pour lesquels le $T_{1/2}$ d'échange de l'albumine avec le pool intravasculaire équivaut à \pm trois heures; les muscles squelettiques et la peau constituent le second pool avec un $T_{1/2}$ d'échange de 24 heures (Figure 1-7) (103).

FIGURE 1-7 Métabolisme normal de l'albumine (103).



La moitié du pool extravasculaire ou 25-30 % des réserves corporelles totales d'albumine se retrouve au niveau de la peau, où une petite quantité d'albumine est moins vite

échangeable (129) et occupe 7 % du poids corporel (Figure 1-7) (103). L'autre moitié de ce pool se retrouve dans les muscles squelettiques (103). Les réserves d'albumine normales absolues intra- et extravasculaires s'élèvent à 2-3 g / kg P.C. (Figure 1-7) (103). Chaque molécule d'albumine quitte donc la circulation (contenant 120 g) une fois par jour pour se mélanger au compartiment extravasculaire (contenant 230 g) et se retrouve dans les espaces lymphatiques (129). De ce pool total d'albumine échangeable (± 350 g, i.e. 4.5 à 5 g/kg), 14 g sont perdus par catabolisme et remplacés quotidiennement par l'albumine synthétisée par le foie (129). La vitesse normale de production d'albumine hépatique s'approche de 0.7 mg/g de foie/heure (129).

Le vieillissement conduit à une plus grande vitesse d'extravasation de l'albumine et chez des vieux rats témoins, l'augmentation de la concentration lymphatique d'albumine est suffisante pour drainer l'albumine extravasée sans augmenter le flux lymphatique (7).

4.3. Valeurs pathologiques

On note une chute de la concentration intravésiculaire de l'albumine quand de grandes accumulations extravasculaires d'albumine sont présentes, ce qui est le cas des patients cirrhotiques présentant de l'ascite (84).

Cependant, dans le syndrome néphrotique et les entéropathies avec pertes protéiques, la distribution intravasculaire est normale ou même élevée par rapport à la concentration d'albumine souvent extrêmement basse dans la phase liquide de l'oedème (84).

Le diabète influence le rapport entre la concentration lymphatique d'albumine et sa concentration plasmatique (7). On étudie ces effets en utilisant les effets diabétogènes de la streptozotocine sur la perméabilité capillaire chez des rats, six, neuf, douze mois après injection (7). Les valeurs de volume de distribution (V_D) interstitiel augmentent avec le temps et avec la sévérité du diabète (7). Ainsi, chez les rats témoins, le V_D interstitiel varie de 0.6 ± 0.1 après six mois à 2.3 ± 1.5 mL/100g de cortex après un an

(7). Chez les rats ayant développé un diabète clinique, la valeur du V_D décuple et passe de 2.0 ± 0.8 après trois mois à 17.6 ± 16.9 après un an (7). Une quantité substantielle du traceur intratubulaire utilisé serait incluse dans la mesure du V_D de l'albumine extravasculaire (7). Le temps de transit moyen de l'albumine du plasma vers la lymphe s'élève à 17.4 ± 2.2 min chez les rats témoins c'est-à-dire après 12 mois. Cette valeur diminue à 10.6 ± 2.7 chez les rats diabétiques, après le même laps de temps (7). Avec le temps, chez les rats témoins, la clairance unidirectionnelle de l'albumine quintuple (de 4.7 ± 0.8 après 6 mois à 22.6 ± 14.8 mL/0.1 msec/100 g de cortex après un an) (7). Chez les rats diabétiques, elle décuple (de 20.2 ± 8.4 après six mois à 278 ± 295 après un an) (7). Le vieillissement et l'évolution de la maladie produisent une augmentation de l'albumine dans la lumière tubulaire, ce qui peut indiquer que sa réabsorption et son métabolisme par les cellules tubulaires s'accroissent mais aucune estimation quantitative ne peut être donnée (7).

5. PROPRIÉTÉS ET FONCTIONS DE L'ALBUMINE

L'albumine présente des qualités: absence de réactions défavorables lorsqu'elle est administrée en intraveineuse, long $T_{1/2}$ dans l'organisme- qui la rendent plus performante que toutes les substances colloïdales artificielles généralement utilisées (dextran, hydroxyéthyl d'amidon) (72). Ses fonctions lui permettent d'occuper une place importante dans plusieurs mécanismes physiologiques.

5.1. Transporteur

L'albumine sert de réservoir à haute capacité pour stabiliser la concentration de nombreux ligands libres (129) et joue un rôle fondamental dans le transport de ligands entre les organes. Elle capture la bilirubine non conjuguée dans les sites de catabolisme de l'hémoglobine et la libère dans le foie pour sa conjugaison à des molécules telles que la glycine et la taurine, suivie de sa sécrétion dans la bile (129). La concentration des ligands

libres s'approche de zéro près du site de capture car tous les ligands qui se dissocient sont repris par les hépatocytes avant qu'ils puissent de nouveau se lier à l'albumine (129).

5.2. Nutriment

L'albumine n'est pas utilisée comme nutriment majeur à cause de son faible contenu en tryptophane et son lent catabolisme ($T_{1/2}=18$ jours) (103). L'albumine pourrait néanmoins être une source d'a.a. pour de nombreux tissus où elle est dégradée (96). Elle est considérée comme un important anti-oxydant extracellulaire car cette protéine peut inhiber la formation de nombreux oxydants ou interagir avec eux (96).

5.3. Agent oncotique

L'albumine est responsable de 80 % de la pression colloïdale osmotique (129) bien qu'elle ne constitue que ± 50 % des substances oncotiquement actives (72).

L'albumine exerce une pression colloïdale osmotique (PCO) qui contrebalance la pression hydrostatique capillaire et retient l'eau dans le compartiment intravasculaire (103). Le taux de fuite/heure de l'albumine vers le compartiment extravasculaire équivaut à 5% du pool intravasculaire ou circulant (103). Ultérieurement, le système lymphatique draine ces protéines puis les renvoie dans la circulation (103). L'équilibre entre ces deux processus maintient une concentration stable d'albumine dans les deux milieux mais celle-ci demeure plus élevée dans le plasma que dans le milieu interstitiel. L'interstitium contient 20-40 % du capital en albumine (103).

Selon l'équation de Renkin $-(\pi_c - \pi_i) = (p_c - p_i) - (\pi_c - \pi_i)$ (π_c : pression oncotique capillaire; π_i : pression oncotique interstitielle; p_c : pression hydrostatique capillaire; p_i : pression hydrostatique interstitielle), une diminution de la pression oncotique dans l'espace vasculaire diminue le volume plasmatique parce que $(p_c - p_i)$ devient prépondérant et génère un flux sortant d'eau (103). Deux mécanismes compensateurs s'établissent: le

premier consiste en un mouvement initial net d'eau de l'espace intravasculaire vers l'espace interstitiel, ce qui augmente le flux lymphatique, occasionnant une diminution de π_i et une restauration de $(\pi_c - \pi_i)$; le second, en un flux net sortant des capillaires qui envahit l'espace interstitiel et augmente π_i , c'est-à-dire diminue $(p_c - \pi_i)$ (103). Le rein provoquera la disparition d'un oedème extravasculaire massif en développement seulement si la rétention liquidienne investit l'espace intravasculaire (103). Le maintien rénal d'une concentration extracellulaire totale normale de Na^+ est capital pour la constance du volume plasmatique parce qu'un déficit en Na^+ provoque une contraction proportionnelle aux espaces intravasculaire et interstitiel et un surplus, une expansion (103).

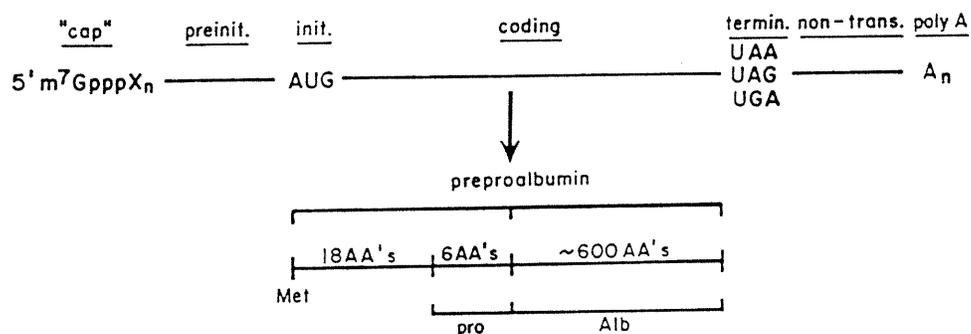
L'hypoalbuminémie traduit soit une diminution de la synthèse d'albumine due à des maladies hépatiques ou à une malnutrition (Kwarshiorkor) soit une augmentation de la perte protéinique (syndrome néphrotique, brûlures importantes) soit une combinaison des deux (96).

6. SYNTHÈSE DE L'ALBUMINE

L'albumine est une des protéines plasmatiques les plus synthétisées dans le foie (22). L'analyse de sa séquence montre qu'elle est produite par triplication intragénique à partir d'un gène primordial (22). Après amplification, ce gène se duplique et produit les protéines suivantes: l'ovalbumine, l'albumine sérique, l' α -foetoprotéine et la protéine liant la vitamine D (22). Une copie du gène de l'albumine sérique est localisée sur le bras long du chromosome 4 (96). Sa synthèse s'effectue dans les polysomes des membranes liées aux réticuli des hépatocytes et le milieu intracellulaire du foie contient ± 1 g d'albumine (103). Le taux de synthèse hépatique varie entre 120 et 200 mg/kg/jour donc 8.4-14.0 g/jour pour un homme de 70 kg (133). Les taux de synthèse fractionnel et absolu normaux d'albumine/jour équivalent, en moyenne, à 10 % du pool intravasculaire

soit 0.2 g/Kg P.C. (103). La synthèse d'albumine diffère d'un individu à l'autre mais est très constante chez un même individu (72).

FIGURE 1-8 Interrelation entre la préproalbumine, la proalbumine et l'albumine (144).

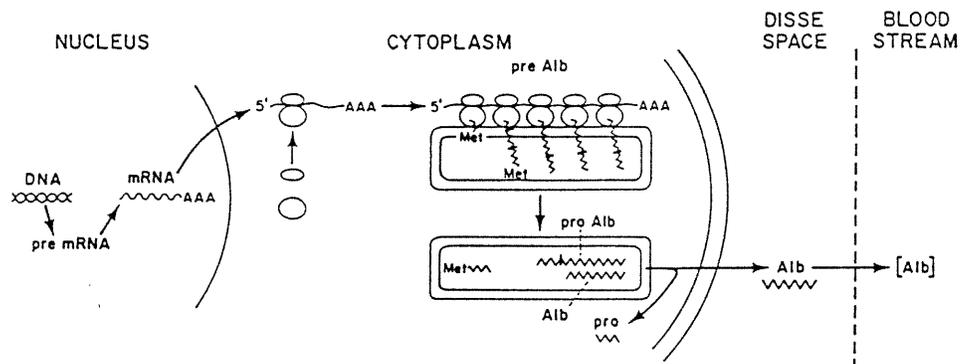


Cette constance individuelle est attribuable aux mécanismes de feed-back régulateur, nutritionnel et hormonal (72).

L'ARNm de l'albumine contient ± 2080 bases. Parmi ces bases, 39 précèdent le codon d'initiation F-MET, 210 suivent le codon de terminaison pour la traduction avec une séquence poly A de 24 bases (Figure 1-8). Les autres bases codent pour la synthèse d'un polypeptide de 609 a.a.: la préproalbumine (Figure 1-8). Les 18 premiers peptides de la terminaison NH₂ de la préproalbumine constitue le signal peptidique hydrophobe et les six a.a. qui suivent, en l'occurrence Arg-Gly-Val-Phe-Arg-Arg, constituent la séquence propeptidique de la proalbumine (Figure 1-8). Le rapport proalbumine/albumine est plus grand dans le REG, moyen dans l'appareil de Golgi et le plus bas dans le REL (144). La proalbumine a été isolée du foie humain (144). La proalbumine n'est pas détectable dans la circulation. L'hydrolyse de ce prosegment semble dépendre des deux derniers a.a.: Arg-Arg. L'absence de clivage de ce prosegment n'empêche pas la sécrétion et sa fonction doit être associée à des événements intracellulaires.

La protéine majoritaire présente dans le plasma du fœtus n'est pas l'albumine mais une α -foetoprotéine (α -globuline). Immédiatement après la naissance, la concentration d' α -foetoprotéine diminue rapidement. Elle est remplacée par l'albumine dont la synthèse est initiée dans le foie avant la naissance, au moment du déclin de la synthèse de l' α -foetoprotéine, ce qui suggère que cette protéine est une albumine foetale (96).

FIGURE 1-9 Synthèse et sécrétion de l'albumine à partir du foie (144).



L'ARNm d'albumine est relâché du noyau et s'associe à des sous-unités ribosomiales dans le cytoplasme pour former un complexe d'initiation (Figure 1-9) (144). La synthèse du peptide NH₂ terminal de la région codante de l'ARNm commence et un oligosome libre est formé. La synthèse du polypeptide continue et la chaîne naissante hydrophobe émerge à la surface de la sous-unité ribosomiale 60S. Ce peptide hydrophobe interagit avec les constituants hydrophobes de la membrane. Le polyribosome s'allonge progressivement et s'attache à la membrane. La synthèse protéique se poursuit et le segment précurseur NH₂ terminal est clivé par une peptidase alors que la protéine est toujours dans la membrane (Figure 1-9). La région NH₂ terminale de la protéine contient un petit segment précurseur hydrophile qui chasse la protéine de la membrane vers l'espace entre les citernes. Une synthèse vectorielle d'albumine à travers la membrane s'effectue et la synthèse de la protéine est achevée. La courte région oligopeptidique est

clivée dans l'espace entre les citernes pendant que l'albumine est transportée du REG au REL aux vacuoles sécrétrices (144). Le contrôle se fait donc aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel (43).

6.1. Méthodes de mesure de synthèse d'albumine in vivo

Les principales techniques utilisées pour mesurer la vitesse de synthèse de l'albumine se basent sur la mesure de la vitesse d'incorporation de l'arginine radioactive (le carbone ou l'azote de la fonction guanidine) dans l'albumine nouvellement synthétisée (87). Pour mesurer la vitesse de synthèse de l'albumine, il faut connaître l'activité spécifique (i.e. l'enrichissement molaire quand des traceurs sont employés) de la guanidine de l'arginine hépatique (87). Après avoir injecté des doses d'albumine radio-marquée par voie intraveineuse (iv) chez des patients, on détermine la courbe de disparition de la radioactivité (144). En considérant que la synthèse équivaut à la dégradation de l'albumine lorsque le pool sérique est à l'état stable, la vitesse de synthèse de l'albumine peut se calculer de manière indirecte à partir de la courbe de disparition sérique (144).

Il y a une corrélation directe entre l'incorporation d'arginine dans l'albumine et la synthèse de l'urée (144). Après l'injection de carbonate marqué au ^{14}C , la mesure de l'arginine radio-marquée dans l'albumine en fonction de la production d'urée permet de calculer la synthèse d'albumine (136,144). La synthèse d'albumine a été étudiée dans le foie isolé perfusé (144).

Les vitesses de synthèse d'albumine se déduisent aussi à partir des mesures du catabolisme de ^{131}I -albumine (8). Cette technique demande des intervalles de temps de plusieurs jours et l'administration de doses élevées de ^{131}I -albumine (8).

Des isotopes stables tels que la ^{15}N -glycine peuvent remplacer les traceurs radioactifs (8). La ^{15}N -glycine est prise de manière constante par voie orale ou en intraveineuse jusqu'à ce que le plateau de la ^{15}N -glycine plasmatique soit atteint, après

approximativement 72 h (8). Il existe une autre technique (technique de l'inondation) qui emploie de la ^{13}C -Leucine (8). L'incorporation d'isotopes dans les protéines est mesurée pendant à peu près une heure, ce qui simplifie l'analyse de la cinétique et facilite les mesures chez le patient instable et en clinique (8). La mesure de la synthèse protéique par des injections rapides d'une grande dose d'un a.a. isotopiquement marqué a été largement utilisée pour mesurer la vitesse de synthèse de protéines qui ne sont pas sécrétées in vivo dans des tissus animaux et humains (8). La dose massive d'a.a. permet l'enrichissement isotopique d'a.a. libres plasmatiques à des valeurs aussi proches que possible des valeurs tissulaires, ce qui minimise l'enrichissement du précurseur direct non marqué impliqué dans la synthèse de protéines (8). Après l'administration des a.a. marqués, un délai est observé avant l'apparition d'albumine radio-marquée dans le sang (8). Cette période ou temps de sécrétion reflète le temps utilisé pour la synthèse de l'albumine dans l'hépatocyte (15 min chez le rat à 37 min) (8). Après le laps de temps de sécrétion, l'albumine radio-marquée apparaît dans le plasma avec un enrichissement qui se rapproche de la linéarité (i.e. l'incorporation dans l'albumine est linéaire pendant ± 50 min) suivi par une diminution (8). Étant donné le court intervalle de temps (50 min) pendant lequel l'albumine radio-marquée reste dans le plasma, la perte de radioactivité dans l'espace extravasculaire est négligeable et ne doit pas être utilisée lors du calcul des vitesses de synthèse de l'albumine (8).

Une autre méthode basée sur l'incorporation de ^{14}C Carbonate dans l'albumine nécessite l'emploi d'isotopes radioactifs et requiert la connaissance de la cinétique de l'urée radio-marquée ainsi que la distribution de l'albumine nouvellement synthétisée (8). Cette technique n'est pas d'un emploi idéal dans des conditions cliniques où des changements rapides du métabolisme de l'albumine se produisent (8).

6.2. Méthodes de mesure de synthèse d'albumine au niveau moléculaire

Pour examiner la synthèse d'albumine au niveau moléculaire, des polyribosomes libres et liés à la membrane sont préparés à partir de foie de lapin en combinant la technique de Blobel et Potter et celle de Bloemendal (144). Le foie est homogénéisé dans une solution tampon de 0.25 M de sucrose. Le surnageant post-mitochondrial, les polyribosomes libres sont séparés de ceux liés à la membrane par une centrifugation à grande vitesse (131 000 g pendant huit heures) sur gradient de sucrose discontinu (1.45 et 1.80 M de sucrose) (144). Les fractions contenant les polyribosomes libres et liés sont aspirés et recentrifugés dans un second gradient discontinu de sucrose pour augmenter leur pureté (144).

La technique de Ramsey et Steele propose une séparation des polyribosomes non purifiés liés à la membrane des polyribosomes libres par une centrifugation à 131 000 g pendant 12 minutes (144). Les polyribosomes liés à la membrane sont ensuite séparés des autres organites (noyaux, mitochondries,..) par une centrifugation à 1470 g pendant cinq minutes et les membranes sont lysées en ajoutant du déoxycholate de sodium (144). Les polyribosomes sont ensuite recueillis par une centrifugation sur gradient discontinu de sucrose (144).

L'hybridation moléculaire est utilisée pour isoler, quantifier et étudier le métabolisme de l'ARNm de l'albumine à partir d'une préparation de polyribosomes (144). L'utilisation de la transcriptase reverse, enzyme capable de synthétiser de l'ADN à partir d'ARNm, requiert un brin d'ARN avec une séquence poly (A)-3', un oligonucléotide (oligo dT), du Mg^{2+} , de l'actinomycine D et les quatre déoxyribonucléosides triphosphates (dXTP) (144). Le brin d'ADN synthétisé est complémentaire de celui de l'ARNm et il y est lié par des ponts hydrogène (144). L'ARNm est dénaturé en milieu alcalin (NaOH) et l'ADNc est recueilli par précipitation dans de l'éthanol et/ou centrifugation sur gradient de sucrose (144). Dans ce cas, les ADNc codant pour toutes les protéines tissulaires sont présentes. Il faut d'abord purifier l'ARNm et préparer une sonde 3H -ADNc ou ^{32}P -ADNc

pour mesurer le contenu en ARNm de l'albumine par la technique d'hybridation (144). Les ARNm sont purifiés par passage sur une colonne d'affinité cellulose-ADN spécifique mais il faut purifier l'ARNm pour générer l'ADNc-cellulose (144).

La dernière technique utilisée pour identifier et quantifier les ARNm codant pour l'albumine est le PCR (Polymerase Chain Reaction) (48). Cette technique est appliquée sur des ARN totaux ou sur l'ARNm avec des oligo(dT) provenant, par exemple, de polysomes hépatocytaires. La transcription de l'ARNm en ADNc s'effectue avec la transcriptase reverse et des oligonucléotides codant pour des petites séquences de l'ADNc de l'albumine, ce qui conduit à la production de l'ADNc spécifique de l'albumine. L'ARNm porte à son extrémité 3' une queue de poly (A) hybridée avec une amorce oligo (dT). Quand le complexe hybride ARN-ADN est formé, l'ARN doit être détruit et remplacé par un brin d'ADN pour former l'ADNc bicaténaire. L'ARNase H morcelle l'ARN. Les morceaux servent de sites d'initiation pour la synthèse du second brin d'ADN par l'ADN polymérase et la plupart sont remplacés par de l'ADN. Cette sonde d'ADNc est marquée avec du ^{32}P en ajoutant de la polymérase, des $^{32}\text{dCTP}$, du dXTP. Cette sonde radiomarquée est ensuite hybridée avec des ARN totaux ou des ARNm provenant de tissu ou de sang. Après le clonage, le criblage est utilisé pour découvrir le vecteur qui contient la séquence d'ADN qu'on désire analyser. On étale les plasmides contenant les différentes séquences d'ADN sur un gel contenant des bactéries ou des virus. Sur ce gel, on applique un filtre de nitrocellulose qui emporte un échantillon de chaque colonie ou plaque. On dénature l'ADN par traitement alcalin puis le filtre est immergé dans une solution contenant la sonde d'ADNc ou d'ARNm purifié et radiomarqué qui recherche son homologue sur le filtre avec lequel il s'hybride. On lave puis on effectue une autoradiographie qui détecte les phages ou colonies contenant le fragment voulu. On peut également faire un Northern blot qui détecte la présence d'ARNm spécifiques (48).

Le PCR donne une réplication sélective et répétitive de segments sélectionnés d'ADN (48). L'ADNc est segmenté par une endonucléase de restriction et dénaturé en simple brin. Une sonde d'oligonucléotides complémentaire de l'extrémité 3' de l'ADN est

ajoutée en excès à une température oscillant entre 50° et 60°. Cette sonde s'hybride à l'ADN et sert d'amorce pour la synthèse de l'autre brin d'ADN qui commence dès l'ajout de désoxynucléotides et d'une polymérase résistant à la température (Taq polymérase). Lorsque la synthèse des brins d'ADN est terminée, le tout est porté à 95° pour mélanger les duplex d'ADN nouvellement formés puis est refroidi à 60° pour permettre une nouvelle synthèse de brins d'ADN grâce aux sondes ajoutées en excès au début de la réaction. Lors de chaque amplification, le nombre de copies de la séquence voulue double et la séquence désirée augmente exponentiellement (48).

6.3. Facteurs influençant la synthèse d'albumine

Plusieurs facteurs influencent la synthèse d'albumine. Parmi ces facteurs, citons: la nutrition, notamment la concentration des a.a.; le jeûne; les hormones; l'éthanol et autres toxines; la pression colloïdale osmotique et plusieurs pathologies. Leurs mécanismes d'interaction avec la synthèse sont variés.

6.3.1. Le jeûne et la malnutrition

Un jeûne pendant 24 h fait rapidement diminuer l'ARN hépatique cellulaire total en accroissant la vitesse de dégradation de l'ARN et en diminuant sa synthèse jusqu'à l'obtention d'un équilibre (123). Il y a également une diminution significative du degré d'agrégation de polysomes liés à la membrane endoplasmique c'est-à-dire une diminution du nombre de sous-unités ribosomiales capables de traduire le message (123) probablement par manque de substrats i.e. d'ARNt. Alors que le jeûne inhibe la vitesse de production de l'albumine, la nutrition restaure rapidement la production d'albumine à des valeurs normales (123).

La malnutrition déprime la synthèse d'albumine de 35-40 % en 24-48 h chez l'homme (103).

6.3.2. Les acides aminés

Des a.a. spécifiques ajoutés en excès au perfusé de foie de donneurs maintenus à jeûn peuvent stimuler la synthèse d'albumine et une nouvelle agrégation de polysomes liés à la membrane endoplasmique (123). L'ornithine, un dérivé de l'acide L-glutamique, n'est pas incorporée dans l'albumine mais stimule la synthèse non seulement de l'albumine mais aussi de l'urée (123). Une augmentation de la production d'urée implique une recrudescence de la quantité d'arginine générée et une augmentation de la production d'ornithine (123). L'ornithine n'est pas uniquement un important intermédiaire du cycle de l'urée mais également un précurseur immédiat de la putrescine qui est le précurseur immédiat de la spermine et de la spermidine (polyamines) (123). Ces polyamines jouent des rôles importants dans le maintien de l'intégrité du système polysomial (123). La stimulation de la synthèse de polyphénylalanine par la spermidine est due principalement à la stimulation de l'initiation de la synthèse de polypeptide (123).

Une réduction du contenu de la diète en a.a. est un facteur important favorisant une diminution de la synthèse d'albumine. Quant au Trp, rappelons qu'il joue un rôle important dans la régulation de la synthèse d'albumine (157).

6.3.3. Les hormones

L'insuline et les glucocorticoïdes augmentent la synthèse et la sécrétion de l'albumine par une stimulation de la transcription de son gène (103). L'hormone de croissance et les oestrogènes sont d'importants régulateurs de la synthèse de l'albumine parce qu'ils peuvent influencer la quantité totale d'ARNm d'albumine dans les cellules hépatiques (103).

Un excès de T₄ et de cortisone augmente les taux de synthèse de l'albumine aussi bien que les vitesses de dégradation de l'albumine sans aucune altération

significative du pool total d'albumine échangeable (123). Au contraire, une carence de T₄ provoque une diminution de la synthèse de l'ARNm et de l'ARN ribosomal.

La cortisone stimule la synthèse des ARN nucléaire, de transfert, ribosomal (123). L'action de la GH sur la synthèse protéique est médiée par une augmentation de la synthèse de l'ARN ribosomal et de l'ARNm (123).

6.3.4. Éthanol et tétrachlorure de carbone

Une exposition aigue à l'éthanol provoque une rupture de la membrane endoplasmique ainsi qu'une perte rapide de la capacité de synthétiser de l'albumine sérique (123). Un excès d'a.a, la spermine et plus spécifiquement l'arginine+spermine sont capables de réduire et d'améliorer les effets aigus de l'éthanol sur le système de synthèse de l'albumine (123).

Le CCl₄ détruit rapidement le RE et diminue les vitesses de synthèse de l'albumine (123).

6.3.5. L'acétaldéhyde

Produit primaire du métabolisme de l'éthanol, l'acétaldéhyde est un agent toxique responsable des effets de l'éthanol (123). Alors qu'il est toxique pour le mécanisme de synthèse de l'albumine au niveau des foies de donneurs qui ont été nourris, aucune toxicité n'est détectée chez les foies de donneurs maintenus à jeûn (123). Grâce au 4-méthyl pyrrazole, un inhibiteur de l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde, il a été démontré que l'acétaldéhyde ne peut expliquer les effets inhibiteurs de l'éthanol sur la synthèse d'albumine (123). Le mode d'action de l'éthanol est différent de celui de l'acétaldéhyde (123). En présence d'éthanol, la synthèse d'albumine est inhibée et coïncide avec la désagrégation des polysomes liés tandis que l'acétaldéhyde est efficace sans cette désagrégation (123). Il y a probablement une étape intermédiaire dans la dégradation

métabolique totale de l'éthanol via la transformation de l'acétaldéhyde en acétate qui est non seulement responsable de l'altération des vitesses de synthèse de l'albumine et de l'urée mais aussi de la rupture du RE (123).

6.3.6. La pression colloïdale osmotique

6.3.6.1. État normal

La pression colloïdale osmotique (PCO) peut aussi contribuer à la régulation de la synthèse de protéines plasmatiques mais n'est pas le facteur principal de la régulation de cette synthèse (96). Cette PCO oscille entre 16 et 18 mm Hg (103). La synthèse d'albumine est régulée par la PCO et/ou par l'osmolalité de l'espace extravasculaire hépatique ou par les substances colloïdales (72) lorsque les fonctions hépatique et gastro-intestinale sont normales (103). La capacité d'augmentation de la synthèse d'albumine que possède l'Homme en réponse à un stimulus adéquat (une PCO basse) est modeste (103). Dans les meilleures situations, une augmentation dépassant deux fois la moyenne normale est exceptionnelle et elle n'excède jamais trois fois la valeur normale (103). Si on traite des patients présentant une $PCO < 20$ mm Hg et une concentration en albumine < 3 g/dL avec cette molécule, son efficacité sera prouvée en vérifiant la PCO (72). L'absence de PCO et des changements de l'hématocrite suggèrent un dommage toxique des membranes des capillaires avec une augmentation de leur perméabilité permettant la constitution d'un oedème interstitiel (72). Il existe alors deux façons de maintenir la concentration d'albumine: par infusion d'albumine sous la forme de protéine préformée ou par un régime riche en a.a. (72). Des altérations du contenu colloïdal au niveau ou à proximité du site de synthèse de l'albumine jouent un rôle important dans la régulation de la production de l'albumine (123). Alors que le plasma qui entre dans le foie et la lymphe qui le quitte possèdent des quantités comparables d'albumine, l'espace interstitiel hépatique, -10 à 15% du poids hépatique-, a un contenu en

albumine correspondant à 10% de celui plasmatique ou lymphatique (123). Le foie, -un système à basse pression hydrostatique-, présente un lit sinusoidal qui offre très peu d'obstacles au transport de molécules de P.M. supérieur à 250 kDa (123). Le paradoxe montre qu'on retrouve un fluide interstitiel avec une très basse concentration d'albumine en équilibre avec les deux constituants hépatiques présentant des concentrations élevées d'albumine et qui sont tous les deux en équilibre rapide peut s'expliquer par le fait que l'espace hépatique interstitiel est une matrice complexe protéines-polysaccharides (123). Cette matrice possède un volume de réserve qui permet de solubiliser de petites molécules et limite la solubilité de grandes molécules comme l'albumine (123).

6.3.6.2. États pathologiques

Lors d'une dysfonction hépatique secondaire, une diminution de la synthèse d'albumine provoquée par la malnutrition, la malabsorption, une diminution du flux sanguin hépatique et des facteurs toxi-infectieux précède les autres signes de dommages hépatiques (103). En phase aiguë, une réaction accompagne les traumatismes et infections bactériennes et diminue la synthèse d'albumine alors qu'un nombre de protéines avec des fonctions de défense bien définies (complément, antiprotéases, fibrinogène) présente une augmentation marquée (103). Un mécanisme régulateur pourrait altérer l'orientation des a.a disponibles vers d'autres voies de synthèse (103). Dans de telles circonstances, l'activation de l'ARNm de l'albumine diminuerait alors que celle de l'ARNm du fibrinogène augmenterait (103). L'interleukine-1 médie la stimulation des cellules T par des macrophages qui possèdent des antigènes (Ag). Elle agit comme un important médiateur dans les changements provoqués dans la synthèse protéique hépatique en phase aiguë (103).

Chez les cirrhotiques, des ascites se développent et causent une diminution de l'albumine sérique mais le pool total d'albumine échangeable est normal ou élevé (123).

L'entéropathie par perte de protéines peut accompagner un désordre intestinal caractérisé par une obstruction lymphatique, un suintement muqueux et des tumeurs spécifiques intraluminales (polypes gastriques) (123). L'hypoalbuminémie qui en découle est le résultat d'un déséquilibre éventuel entre la perte protéique et l'incapacité du foie à synthétiser des quantités croissantes d'albumine (123).

Dans le syndrome néphrotique, la synthèse de l'albumine et de son ARNm au niveau hépatique augmente, ce qui se traduit indirectement par une hypercholestérolémie (43), l'hépatocyte conjuguant une synthèse d'albumine accrue à une synthèse de cholestérol accrue. Cette augmentation est modérée car si la synthèse de l'albumine est inversement proportionnelle à la pression oncotique sérique, elle n'est maximale que si l'apport alimentaire est riche en protéines (43). La majoration de l'apport protéique accroît rapidement la synthèse hépatique d'albumine ainsi que le contenu hépatique en ARNm dans les modèles expérimentaux et ceux présentant de la protéinurie (43). Elle augmente également l'excrétion d'albumine (au-delà de 50 % de l'augmentation de la synthèse hépatique d'albumine sont excrétés) (43).

CHAPITRE II. TRANSPORT RÉNAL DE L'ALBUMINE

1. FILTRATION DE L'ALBUMINE

La filtration glomérulaire est la première étape dans le mécanisme de formation de l'urine (116). La vitesse à laquelle l'ultrafiltrat est formé répond aux forces de Starling (116). La membrane basale glomérulaire (MBG) est la première barrière de filtration rénale qui restreint le passage de protéines plasmatiques dans l'urine (9).

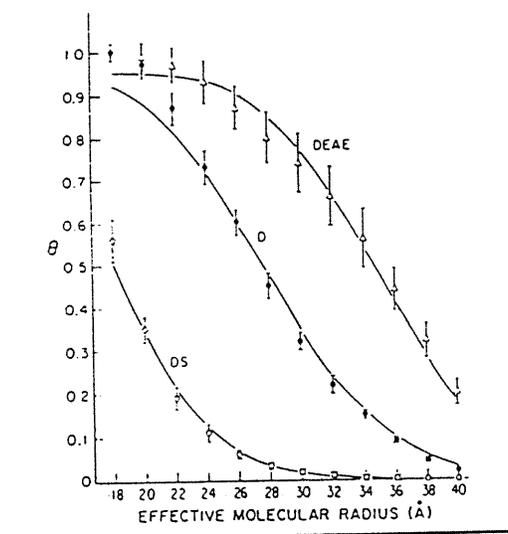
Le procédé de filtration consiste en l'entrée de $\pm 1/5$ à $1/3$ du plasma circulant dans le glomérule et en la sortie d'un ultrafiltrat par le tubule proximal (TP) (25). Malgré son extraordinaire perméabilité à l'eau et aux petits solutés, la paroi capillaire glomérulaire (PCG) empêche le passage des protéines plasmatiques (3,116). Les petites molécules de taille similaire ou inférieure à celle de l'inuline traversent la paroi capillaire comme l'eau alors que le transport de molécules de dimension supérieure diminue progressivement jusqu'à l'obtention de faibles valeurs comme c'est le cas pour l'albumine (116). Malgré la très petite résistance de la paroi capillaire, le glomérule empêche la filtration de macromolécules circulantes de P.M. supérieur à plusieurs centaines de kDa, ce qui implique une concentration minime de plus petites protéines plasmatiques dans l'ultrafiltrat glomérulaire (25). En effet, les substances plus petites que l'inuline ainsi que l'inuline se retrouvent dans le filtrat glomérulaire à une concentration identique à celle présente dans la phase aqueuse plasmatique (25). D'autre part, l'albumine sérique est moins filtrée (25). L'application de l'électrophorèse sur disque ultramicroscopique pour des nanolitres d'échantillons d'ultrafiltrat glomérulaire ou de fluide de TP obtenus par microponction indique que la concentration d'albumine dans l'ultrafiltrat glomérulaire approxime 1 mg/dL (25). Par contre, la concentration de l'albumine plasmatique varie entre 3 et 4 g/dL, soit 3 000 à 4 000 fois supérieure à celle présente dans l'ultrafiltrat (25). Le rapport des concentrations d'albumine présentes dans le fluide de l'espace de Bowman

et dans le plasma (= coefficient de tamisage) est inférieur à 0.1 % de celui de l'inuline (3,25).

1.1. Permsélectivité de la paroi capillaire glomérulaire normale

L'interrelation inverse existant entre le coefficient de tamisage et le rayon de Stokes des protéines anioniques ou cationiques indique que la PCG possède des propriétés de filtre sélectif en fonction de la taille des molécules (25).

Figure 2-1 Graphique montrant le rapport des concentrations filtrat /plasma (Θ) variant en fonction de la taille moléculaire pour le dextran sulfate (DS), le dextran neutre (D) et le diéthylaminoéthyl dextran (DEAE) (3).



Cependant, la plus grande restriction pour les protéines anioniques de rayon identique ou équivalent démontre l'existence, dans la PCG, d'une barrière électrostatique (25). On a étudié la permsélectivité glomérulaire en utilisant la technique de clairance fractionnelle (CF) (3,25,111). La CF (clairance fractionnelle) d'une

macromolécule à tester se définit comme la clairance de cette substance divisée par le GFR (vitesse de filtration glomérulaire) de l'eau (25,111). Si la clairance de l'inuline est utilisée pour mesurer le GFR, la CF de la macromolécule se calcule à partir des concentrations urinaire (U) et plasmatique (P) de la substance étudiée et de l'inuline: $CF = \frac{(U/P)_M}{(U/P)_I} \times GFR$ (M: macromolécule; I: inuline) (3,25,111).

Si cette macromolécule n'est ni réabsorbée ni sécrétée par le tubule, la CF de la macromolécule équivaudra au coefficient de tamisage (3,25,88).

Chez le rat, les études de microponction montrent que la concentration d'albumine dans le filtrat glomérulaire vaut 10 à 20 mg/dL avec une GSC (rapport des concentrations de la protéine: filtre glomérulaire / eau plasmatique) de 0.001 à 0.005 (105). Avec une concentration dans le filtrat glomérulaire de 0.1 mg/dL, l'albumine filtrée pourrait être complètement excrétée dans l'urine alors qu'à une concentration de 1-2 mg/dL, l'absorption tubulaire d'albumine pourrait être considérable et justifier les 10 à 15% du "turn-over" plasmatique total de l'albumine chez le rat (105).

Les facteurs qui agissent sur la filtration glomérulaire de macromolécules sont (25):

- 1- la taille moléculaire
- 2- la charge moléculaire
- 3- la configuration moléculaire
- 4- l'hémodynamique glomérulaire.

1.1.1. La taille moléculaire

Les techniques de clairance sont utilisées pour étudier la filtration glomérulaire de macromolécules in vivo (25,88). Pour ce faire, deux polymères non protéiques, les dextrans (sulfatés, liés à du DEAE (3)), polymère du d-glucopyranose (88,116), et le polyvinylpyrrolidone (PVP) (25) sont utilisés comme solute de référence (25,88,111).

Les dextrans anioniques (sulfatés) montrent une filtration restreinte quelles que soient les tailles moléculaires étudiées (Figure 2-1) (25,111).

Si un dextran n'est ni sécrété ni réabsorbé par le tubule, la mesure de sa filtration glomérulaire est fournie par le rapport de sa clairance sur la clairance de l'inuline (25,88). Ce rapport ou CF du dextran, équivaut au rapport de la concentration du dextran dans l'espace de Bowman sur celle présente dans le plasma (25,88). Les dextrans et ses dérivés montrent une vitesse d'excrétion équivalant celle de filtration (aucune sécrétion ou réabsorption nette) (25,88). Donc, la CF de dextran est une mesure facile de la perméabilité, variant de zéro (impermeabilité du dextran) à un (perméabilité de l'inuline) (25,88) lorsque la taille excède 60 Å (116).

La clairance d'un dextran neutre peut égaler celle de l'inuline, i.e. 1 (25). Les dextrans neutres maintiennent leur CF à 1 jusqu'à ce qu'ils atteignent une taille de 20 Å (25,88).

FIGURE 2-2. Clairances fractionnelles du dextran neutre (D) en fonction du rayon d'Einstein-Stokes (65).

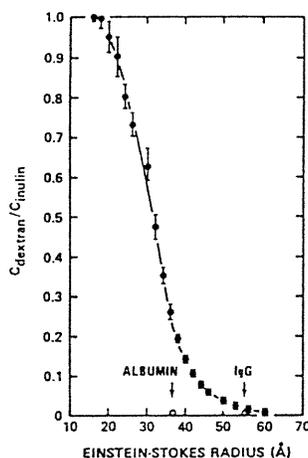


Fig. 2 A plot of the fractional neutral dextran clearance ($C_{\text{dextran}}/C_{\text{inulin}}$) as a function of the Einstein-Stokes radius (Å) (effective molecular radius) in 20 healthy adult volunteer. (\pm S.E.M.). Glomerular fractional albumin and IgG clearance for the rat is shown (O) for comparison. Note that no restriction to filtration is found for molecules <20 Å, with nearly complete restriction to filtration for molecules >60 Å. The fractional clearance for a neutral dextran molecule the size of albumin (36 Å) is approximately 0.25.

Au-delà de 20 Å, les CF moyennes diminuent progressivement en fonction d'une augmentation de la taille moléculaire, s'annulant à 42 Å et plus (Figure 2-2) (25,111). Les

CF des dextrans anioniques, valant 0.01, diminuent progressivement en fonction de l'augmentation de la taille moléculaire mais pour chaque taille utilisée, la CF du dextran sulfate est inférieure à la clairance correspondante du dextran neutre de taille similaire (25).

Pour de très grandes tailles moléculaires, les différences existant entre les deux types de dextrans (sulfatés et neutres) diminuent lorsque leur CF s'approche de zéro (25).

Le GSC d'un dextran de 36 Å est au moins trois fois plus grand que celui qui correspond à la forme anionique (105). À 30 Å, la différence est deux fois réduite et entre 18 et 20 Å, le GSC des dextrans neutres est moins de deux fois aussi élevé que le dextran sulfaté (105).

1.1.2. La charge moléculaire

La restriction de la filtration de l'albumine est due au fait que c'est une molécule polyanionique à pH physiologique et au glomérule qui possède une barrière sélectionnant les charges pour la filtration macromoléculaire (25).

Etant donné que les dextrans neutres et sulfatés ne sont significativement ni sécrétés ni réabsorbés par les tubules, on peut conclure, en fonction de ce qui a été décrit précédemment, que la charge moléculaire est un important facteur pour déterminer le taux de filtration macromoléculaire (25).

En ce qui concerne la protéine que nous étudions, la valeur du CF de l'albumine (36 Å) s'approche de celle du dextran sulfate (± 36 Å) (25). La restriction de la filtration de polyanions circulant (albumine, dextran sulfate) provient de la présence de charges négatives sur la PCG (25). Comme les interactions électrostatiques de cette PCG retardent la filtration de polyanions, il est à prévoir que la filtration des polycations augmenterait (25). En effet, les CF des dextrans cationiques, valant 0.42, sont plus grandes que celles des dextrans neutres (valant 0.15) de taille suffisamment élevée pour qu'une diminution significative de la filtration des dextrans neutres se produise (25). La

CF des dextrans cationiques ayant une taille de 36 Å est supérieure à celle des dextrans neutres et sulfatés et de l'albumine de taille similaire (25). La PCG du rat aurait une concentration apparente de charges négatives de 120 à 170 mEqL (25).

1.1.3. La configuration moléculaire

Les configurations et les formes des protéines globulaires et des dextrans influencent leur CF (25). La configuration moléculaire affecte la filtration macromoléculaire à travers la PCG (25).

La CF d'un dextran neutre, un ressort flexible en solution, est comparée à celle du ficoll, un polymère rigide chez des rats Munich-Wistar (3,25). Le dextran neutre est plus rapidement filtré que le ficoll, quelle que soit leur taille (3,25). Avec une taille similaire à celle de l'albumine (36 Å), la CF moyenne du ficoll atteint 50 % de la valeur de celle du dextran neutre (25). Donc, même si l'albumine a la forme d'une sphère rigide tel que le ficoll, la configuration moléculaire ne peut expliquer la différence des valeurs des clairances obtenues pour les dextrans neutres et l'albumine (25). Cette configuration a donc peu d'influence sur le passage transglomérulaire des macromolécules (25).

1.1.4. L'hémodynamique glomérulaire

Les quatre facteurs impliqués dans l'ultrafiltration sont: la vitesse initiale du flux plasmatique glomérulaire (Q_A), la différence de pression hydrostatique transcapillaire moyenne (ΔP), la concentration initiale de protéines plasmatiques dans les capillaires glomérulaires (C_A), le coefficient d'ultrafiltration (K_f) (25,97).

Une petite fraction du filtrat incluant les dextrans (30-60 Å) passent au travers de larges pores glomérulaires non sélectifs et montre que la CF des dextrans se superpose à celle de l'albumine (124). La CF de la majorité des albumines anioniques ($pI=4.0-4.5$) excède significativement celle des albumines plus cationiques ($pI=4.5-5.5$) à tous les

stades de protéinurie (124). Donc, la filtration facilitée des polyanions ou la réabsorption tubulaire préférentielle de polycations peut être évoquée pour expliquer la composition finale de la protéinurie (124).

1.2. Filtration de l'albumine chez l'individu normal

1.2.1. Structure des membranes basales capillaires

La PCG comprend trois couches distinctes: la couche interne de cytoplasme fenestré d'origine endothéliale, la couche moyenne formée par la MBG, une couche externe formée d'interdigitations cytoplasmiques d'origine épithéliale (Figure 2-3) (116). A cause de la largeur des fenêtres endothéliales (1000 Å) et des fentes épithéliales de filtration (300 Å) (espaces qui séparent les pédicelles), les couches endothéliale interne et épithéliale externe de la PCG ne paraissent pas capables de servir de barrières principales pour le passage transmurale des protéines plasmatiques (Figure 2-3) (116). La voie suivie par les traceurs comme la ferritine dans l'espace de Bowman est extracellulaire (116). Initialement, la molécule pénètre par les fenêtres endothéliales, passe la MBG puis un diaphragme qui traverse l'espace entre les interdigitations épithéliales (fente de filtration) (116) pour atteindre l'espace urinaire (Figure 2-3) (97).

La filtration glomérulaire prend place dans la région mésangiale (97). L'albumine et autres grandes molécules s'accumulent sous la lamina densa de la MBG (116). D'autres larges traceurs pénètrent dans la lamina densa de la MBG et s'accumulent dans la lamina rara externe sous la fente de filtration (116). Les fentes de filtration possèdent des ouvertures rectangulaires ou pores (50 x 120 Å) qui sont assez petites pour empêcher la pénétration de quantités significatives de protéines de la taille de l'albumine et de plus grandes molécules (116). Par des techniques cytochimiques, il a été démontré que les trois couches de la PCG sont richement dotées de composants chargés négativement (116).

Les glycoaminoglycans (GAG) de la MBG sont localisés dans les lamina densa et rara (116). La membrane entourant les cellules endothéliales et les pédicelles épithéliaux est composée de glycoprotéines riches en acide sialique (116).

FIGURE 2-3 Représentation schématique de la paroi capillaire glomérulaire (97).

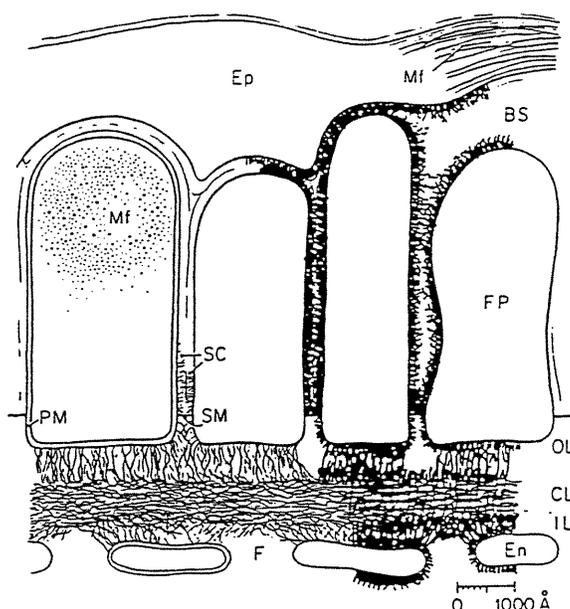


FIG. 5. Diagram of glomerular capillary wall. The left side represents the appearance after metal staining probably of protein portions of the basement membrane. The right side shows the appearance of polyanionic glycoproteins in the capillary wall stained with ruthenium red and osmium tetroxide. The inner layer of the basement membrane (IL) (lamina rara interna) seems to consist largely of glycoproteins continuous with the cell coat of endothelial cells (En). It lies beneath endothelial fenestrations (F). Some glycoprotein fibrils lie in the central layer (CL) (lamina densa) probably bound to small collagenous fibrils. The outer layer (OL) (lamina rara externa) has a portion of the foot processes (FP) embedded in it. The surface coat of the latter seems to contribute glycoprotein to the rest of this layer. The slit membrane (SM) (slit diaphragm) marks the outer boundary of the basement membrane. It is covered by a dense surface coat (SC) which continues over the plasma membrane (PM) of adjacent foot processes. The surface coats partially or completely fill the filtration slits in the living animal. The surface coats partially or completely fill the filtration slits in the living animal. The epithelial cell cytoplasm (Ep) and the foot processes contain myofilaments (Mf) which probably function during retraction and loss of the foot processes. The urinary space is also known as Bowman's space (BS). (From Latta and Johnston (1976).)

Ces glycoprotéines pourraient occuper les fenêtres endothéliales et les pores de filtration épithéliales et, avec les GAG de la membrane basale, pourraient constituer une matrice continue de polymères anioniques s'étendant de la lumière capillaire à l'espace de Bowman (116). Les pores hydratés à l'intérieur de cette matrice sont étroits pour les polyanions et larges pour les polycations (116).

En microscopie électronique, la membrane basale des capillaires glomérulaires est composée d'une seule couche dense aux électrons (lamina densa) qui atteint $\pm 2500 \text{ \AA}$ d'épaisseur (167). Cette lamina densa contient beaucoup de filaments de 3 nm étroitement entrelacés. Elle est limitée du côté luminal, par l'endothélium et du côté contra-latéral, par les cellules épithéliales (167).

La membrane basale est une structure complexe contenant plusieurs protéines différentes: les collagènes de type IV et V, l'héparane et le dermatane sulfates, les protéoglycans chondroïtine sulfatés, les glycoprotéines structurales (la laminine, l'entactine, la fibronectine, le nidogène et les composants P-amyloïdes) (9,167,171). Les glycoprotéines sont d'importants composants structuraux des membranes basales (171). Les protéoglycans maintiennent l'intégrité de la matrice extracellulaire par des interactions avec d'autres glycoprotéines et agissent comme ligands d'adhésion aux surfaces membranaires des cellules (171).

L'acide sialique et l'acide N-glycolylneuraminique sont des constituants polyanioniques importants des glycoprotéines de la membrane qui, avec les GAG, déterminent la charge de la barrière membranaire (171). En terme de sélectivité de taille, la PCG normale est une membrane constituée de pores uniformes de 50 \AA (25).

1.2.1.1. Collagène

Le collagène est le composant majeur de la membrane basale capillaire glomérulaire et se concentre dans la lamina densa (167). Il détermine majoritairement les caractéristiques de la taille des pores pour la permselectivité (filtration) et assure la stabilité à la structure (167).

1.2.1.2. Laminine

Elle est localisée dans la lamina rara de la membrane basale qui s'accolle à l'endothélium et à l'épithélium (167). Elle assure l'adhésion des cellules endothéliales et épithéliales (podocytes) à la membrane basale et est impliquée dans la perméabilité de charge (167). En effet, elle contient de l'acide sialique ($\pm 5\%$) et porte, de ce fait, une charge anionique substantielle (167).

1.2.1.3. Fibronectine

La fibronectine se concentre également dans la lamina rara (167). Dans le glomérule, elle se situe à l'interface mésangium-endothélium (167). Tout comme la laminine, elle porte également une charge anionique occasionnée par de l'acide sialique ($\pm 2\%$) (167). Elle provoque l'adhésion cellulaire à la membrane basale et est impliquée dans la perméabilité de charges (167).

1.2.1.4. Protéoglycans

Les protéoglycans sont des glycoprotéines très sulfatées qui ont tendance à se localiser dans la lamina rara (167). L'héparane et le dermatane sulfates sont les GAG majoritaires qui s'associent covalentiellement à des protéines pour former des protéoglycans glomérulaires (héparane sulfate: $\pm 85\%$, chondroïtine et dermatane sulfates: 15%) (42,132,167).

Ils sont fortement anioniques et contribuent à la sélectivité des charges de la barrière de filtration glomérulaire (42,167). L'extraction de l'héparane sulfate de la MBG de rats par digestion enzymatique provoque une augmentation de la perméabilité à la ferritine et à l'albumine (132).

Une étude *in vitro* a été effectuée avec de l'hexadiméthrine (HDM) mise en présence d'une MBG isolée de chien (143). Cette molécule cationique se lie aux sites anioniques de la MBG et provoque une protéinurie lorsqu'elle est infusée *in vivo* (143). Pour son action, le ^3H -HDM dépend du pH, ce qui porte à croire qu'il se lie aux groupements carboxyles plutôt qu'aux groupements sulfates des protéoglycans de la MBG (143). En effet, une substitution des carboxyles par du méthyl ester glycine non ionisable, démontre qu'aucune liaison de l'HDM à la MBG ne se produit (143). L'électrophorèse sur acétate de cellulose de fractions de GAG extraits de la MBG traitée avec de l'hexadiméthrine montre que la modification des carbonyles n'altère pas la charge ni le contenu en héparanes sulfates de la MBG (143). Les carboxyles sont quantitativement plus importants que l'héparane sulfate pour la liaison de l'HDM *in vitro* (143). Etant donné que l'HDM conduit à une protéinurie *in vivo*, les carboxyles peuvent être considérés comme importants pour maintenir une perméabilité normale (143).

1.2.2. Fonction des membranes basales capillaires

Non seulement la membrane basale participe aux propriétés physiques et à la stabilité structurale de la paroi des vaisseaux mais elle fournit une trame sur laquelle les cellules endothéliales adhèrent et se régénèrent, croissent et reconstituent la paroi vasculaire après la lésion (167). Les membranes basales capillaires servent de filtre et tamisent les lipoprotéines et les protéines en fonction de la perte du rôle de la barrière endothéliale normale (167).

Dans le glomérule, les podocytes paraissent être le principal déterminant structural de la conductivité hydraulique à travers la paroi capillaire (167). Les protéoglycans et les sialoprotéines de la membrane basale représentent une très petite fraction de la charge anionique globale de la membrane basale (surtout les carboxyles) et le contenu glomérulaire total (167).

1.3. Filtration d'albumine chez l'individu diabétique

1.3.1. Structure des membranes basales capillaires

Le filtre glomérulaire est une barrière fonctionnelle présentant des pores d'à peu près 5.5 nm et une charge électrique négative (162). La réduction de la synthèse des composants anioniques de la membrane basale (héparane sulfate) maintenant normalement les sites anioniques et la taille des pores de la MBG est associée à la protéinurie (162). L'extension de cette protéinurie est la conséquence de l'altération de la membrane basale et /ou des podocytes (167). L'augmentation de la porosité de cette membrane glomérulaire est attribuée à une diminution du nombre de ses charges négatives chez les diabétiques de type I, de son contenu en acide uronique. Une diminution de la coloration de cette membrane, lorsque des colorants polycationiques sont employés, est en relation avec une diminution de ses protéoglycans sulfatés (171). Si on perfuse les reins de diabétiques avec de l'héparatinase et la neuraminidase, on constate que les sialoprotéines et les protéoglycans sulfatés (héparanes) présents dans les membranes des podocytes et dans la membrane basale sont altérés (167). Chez le diabétique, la diminution de l'acide sialique est proportionnelle à la durée du diabète et est probablement due à une diminution de la sialidase, enzyme catabolisant l'acide sialique, siégeant dans le cortex rénal (171).

La protéinurie et l'augmentation de la perméabilité vasculaire associées au diabète sont occasionnées par la perte de l'intégrité fonctionnelle de la barrière des podocytes et de l'endothélium plutôt que par l'altération fonctionnelle de la barrière de la membrane basale (167). Le polymorphisme génétique des enzymes sensibles au glucose utilisées dans le métabolisme des GAG conduirait à une réduction importante de l'héparane sulfate chez les patients prédisposés génétiquement et présentant un mauvais contrôle de leur glycémie (162). Cette hypothèse non encore prouvée ou hypothèse de

Steno, expliquerait pourquoi seulement 35 % des diabétiques insulino-dépendants peuvent développer une néphropathie diabétique (162).

De grandes quantités d'albumine, complément, IgG et de fibronectine se lient aux membranes basales et ce phénomène pourrait être relié à la glycation de la membrane basale (167).

1.3.1.1. Collagène

Chez le diabétique, l'augmentation de l'incorporation de Pro marquée dans l'hydroxyproline reflète l'augmentation de la synthèse de collagène dans les MBG (171). Une autre technique utilisée pour démontrer une augmentation de la synthèse de collagène dans le diabète est la mesure par RIA du taux sérique du domaine 7S du collagène IV (171). Ce domaine est formé par la liaison des régions terminales des quatre types de collagène IV (171). Une augmentation du taux sérique du domaine 7S peut résulter d'une augmentation de la dégradation de MBG plutôt que d'une augmentation de leur synthèse ou de leur écoulement subséquent dans la circulation (171).

Dans le diabète, le marquage des MBG par technique immunocytochimique utilisant des molécules d'or tapissées de protéine A et d'anticorps spécifiques montre une altération de la distribution du collagène IV le long de la membrane (171). Chez des rats normaux, la coloration est confinée à la lamina densa centrale (171). Chez les rats atteints d'un diabète depuis sept à quinze mois, le marquage est restreint au site sous-endothélial de la lamina de la MBG épaissie (171). L'augmentation de cette biosynthèse de collagène entraîne aussi une augmentation de l'activité spécifique des enzymes post-traductionnelles (171). La quantité d'hexoses liée non-enzymatiquement au collagène de la membrane basale augmente significativement (deux fois la normale) (167). Il y a une diminution de la quantité de collagène IV accessible à des agents pontants dans la membrane basale isolée de glomérules d'animaux diabétiques en présence de grosses concentrations de glucose in vitro (167). La glycation et le pontage médié par la lysyl oxydase impliquent

les lysines (167). Si les lysines sont glyquées, elles pourraient ne plus être disponibles pour la formation de ponts médiés par la lysyl oxydase (167). Par contre, le pontage du collagène I médié par la lysyl oxydase est augmenté (167).

1.3.1.2. Protéoglycans

Les héparane sulfates constituent un groupe homogène de GAG anioniques de densité de charge variable (132). Il n'y a pas uniquement une diminution de la synthèse et de la concentration de l'héparane sulfate d'approximativement 0.3 fois la normale dans les glomérules de patients diabétiques (132), il y a également une diminution de sa sulfatation (167). Une diminution d'héparane sulfates peut provenir d'une synthèse diminuée, d'une augmentation de la dégradation et/ou d'une impossibilité d'interaction de cette molécule avec les glycoprotéines de la membrane glomérulaire (132,171). Il est possible qu'un héparane sulfate avec des propriétés physico-chimiques et fonctionnelles différentes soit synthétisé (132).

Chez le diabétique, la diminution des GAG au niveau de la membrane basale s'accompagne d'une importante augmentation d'hexoses qui se lient au collagène, ce qui suggère une redistribution des macromolécules de cette membrane (15).

Etant donné que l'héparane sulfate confère la charge négative à la MBG, la protéinurie cliniquement détectable chez les patients diabétiques et normaux est attribuée à la perte de l'héparane sulfate (132). Le diabète peut empêcher l'interaction de l'héparane sulfate avec ses sites de liaison situés dans la matrice extracellulaire ou à la surface cellulaire à cause de la glycation des protéines structurales et/ou des altérations des phospholipides des membranes cellulaires avec lesquels les protéoglycans interagissent (171).

On peut induire un épaissement de la membrane glomérulaire par injection intraveineuse d'un anticorps anti-héparane sulfate (171).

Les GAG sont des anticoagulants. Ils empêchent la pénétration des macromolécules dans l'espace extracellulaire, ne précipitent pas et participent aux processus de réparation micro- et macrovasculaires. La diminution de leur synthèse expliquerait l'augmentation de l'hyalinisation, la fibrose et l'athérosclérose (14).

1.3.1.3. Fibronectine

La quantité de fibronectine dans la membrane glomérulaire des patients diabétiques ne diffère pas significativement de celle calculée pour un groupe témoin (171). On a démontré, cependant, que la fibronectine plasmatique chez des chiens diabétiques est fortement glyquée *in vivo* (171). Cette fibronectine glyquée se lie moins avidement au collagène et à l'héparine (171). Les anomalies de structure et de fonction de la fibronectine constitueraient un des nombreux éléments permettant le développement de la physiopathologie de la microangiopathie diabétique (171).

1.3.1.4. Laminine

On mesure, par RIA, une diminution de la laminine chez les patients diabétiques (171) (0.7 fois la normale) (167). Par contre, d'autres études démontrent une augmentation de la laminine chez des patients insulino-dépendants tandis qu'aucun changement n'est rapporté chez des patients présentant un diabète de type II (171).

1.3.1.5. Acides aminés

Les changements au niveau de la membrane basale incluent une augmentation de la concentration en hydroxyproline, hydroxylysine, glucosyl-galactosyl hydroxylysine (171), une augmentation du rapport hydroxylysine/lysine, une augmentation proportionnelle d'hydroxylysine associée aux dissaccharides glucose-galactose et une

petite diminution du nombre d'acide sialique (167). Chez les rats, après une à six semaines de diabète induit par la streptozotocine, il y a une augmentation de la synthèse en hydroxylysine marquée au niveau des membranes basales et/ou dans les glomérules (171). Cet effet est annulé partiellement ou totalement après un traitement à l'insuline (171). Chez les rats avec un diabète de 14 semaines, il n'y a pas d'augmentation significative de la synthèse d'hydroxylysine (171).

L'activité de la glucosyltransférase augmente dans le cortex rénal des rats diabétiques traités à l'alloxane ou à la streptozotocine (171). Elle augmente en fonction du nombre d'unités dissaccharidiques liées à l'hydroxylysine dans la MBG des patients diabétiques (171). La N-glycation contribue significativement à l'augmentation du contenu en glucose dans les glycoprotéines de ce type de membrane chez le diabétique (171). La N-glycation pourrait se différencier de la glycation catalysée par l'enzyme glucosyltransférase (171).

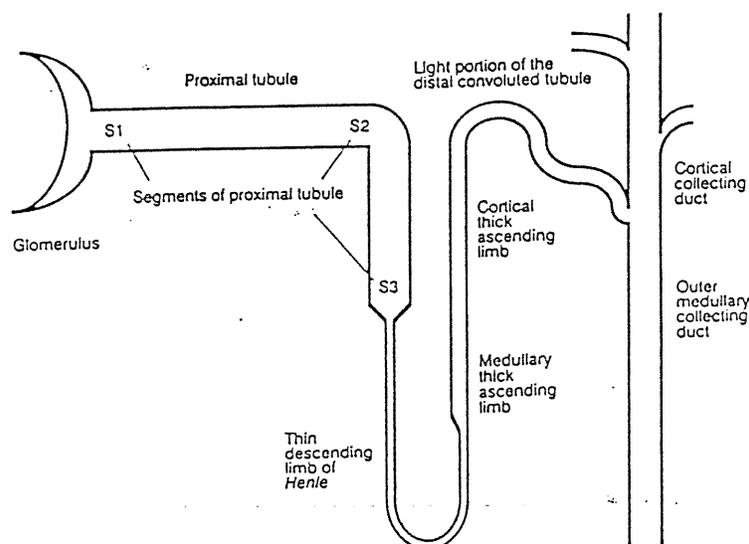
2. RÉABSORPTION DE L'ALBUMINE

Le transport intracellulaire de l'albumine par la cellule du TP suit sa filtration et conduit à son catabolisme dans la cellule. Cette absorption s'effectue par endocytose (127). Elle est sélective et implique une dépense d'énergie (106,127). L'endocytose d'adsorption est spécifique et commence par la liaison de l'albumine à un récepteur de la membrane cellulaire avant son incorporation dans les vésicules d'endocytose (163). Dans le rein, l'accès des protéines aux sites d'endocytose situés à la base des microvillosités est limité par les contraintes électriques et géométriques (126,127). En effet, le passage de l'albumine entre les microvillosités de la membrane de la bordure en brosse (MBB) à travers des espaces étroits devient l'étape limitante de la capture d'albumine (104,127). La taille et la charge négative nette de l'albumine de même que le champ électrique relié aux charges négatives de la membrane luminale limitent son accès aux sites d'endocytose (104,127).

Donc, le type de charges positives (lysine ou arginine) (141), la charge moléculaire totale (39), la taille et la densité de l'albumine, la configuration moléculaire et/ou la distribution de charges électriques (39) aussi bien que les interrelations complexes structurales entre les microvillosités et les sites d'endocytose peuvent jouer des rôles importants dans la sélectivité de la capture tubulaire de l'albumine en particulier (126) et l'endocytose subséquente par le TP (39).

Le processus de transport peut se saturer lorsque la capacité de liaison des sites d'endocytose est dépassée (127). On remarque une endocytose significative d'albumine seulement dans le tubule contourné proximal (TCP), i.e. les segments S1 et S2 du TP (Figure 2-4) (88,115). L'endocytose tubulaire se produit donc dans les premiers centimètres du néphron (88,115).

Figure 2-4. Représentation schématique du néphron (121).



Il est possible qu'une endocytose baso-latérale se produise également lorsque l'albumine endogène non filtrée diffuse des capillaires interstitiels vers le tissu interstitiel puis vers les membranes basales tubulaires, les espaces intercellulaires et jusqu'à leurs jonctions lâches (21). La membrane baso-latérale est en effet le site d'inactivation des

hormones peptidiques par digestion enzymatique par des peptidases liées à la membrane ou par endocytose (125). L'activité d'endocytose et la capture de protéines à travers la membrane baso-latérale seraient cependant peu importantes par rapport à l'activité retrouvée au niveau de la membrane apicale (104,125).

2.1. Mécanismes

Un système double de transport serait utilisé pour la capture d'albumine (32,127). Il combinerait l'endocytose d'adsorption médiée par des récepteurs (système semi-spécifique mais à capacité modeste) et l'endocytose en phase fluide (système à haute capacité mais sans spécificité) (32,127).

Les reins jouent un rôle important dans l'homéostasie des protéines filtrées de faible P.M. et des hormones peptidiques par suppression de l'excès de ces protéines de la circulation (125). Les reins sont donc impliqués dans la récupération et la conservation d'a.a. (NH₂) des protéines filtrées (125).

Le processus transcellulaire rapide, l'absorption à grande capacité et l'hydrolyse des protéines sont essentiels pour la récupération de l'azote provenant de l'albumine filtrée surtout lors d'une augmentation de la quantité filtrée (125). Selon Park, il n'y aurait pas de libération significative de catabolites à travers la membrane apicale (125). En effet, il n'y a pas d'intermédiaires ou de produits finaux d'hydrolyse présents en quantité significative dans la lumière tubulaire. Par ailleurs, il n'y a pas de mouvement transtubulaire ni de libération significative de protéines intactes à travers la membrane baso-latérale (125).

Par contre, l'accumulation tubulaire de protéines et la sortie des produits de l'hydrolyse dans le liquide péritubulaire n'augmentent pas linéairement avec la charge en protéines (125). Au début, l'accumulation totale de protéines dans la cellule tubulaire augmente rapidement et tend à se saturer puis diminue avec le temps (125). L'hydrolyse des produits dans le liquide péritubulaire augmente avec le temps pour s'approcher de la

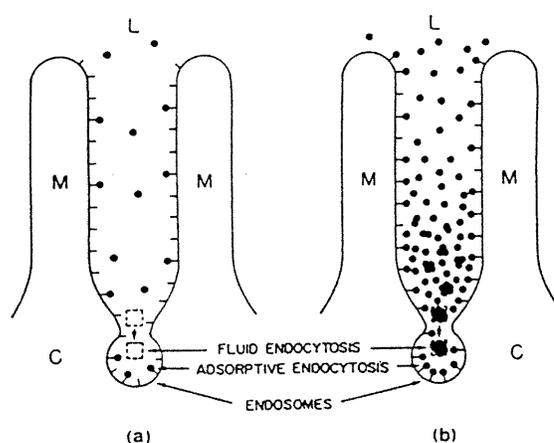
vitesse d'absorption (125). Il y a une interrelation linéaire entre l'hydrolyse et l'accumulation d'albumine dans les tubules, ce qui suggère que la capacité hydrolytique est grande par rapport à la quantité de protéines présentes dans des conditions physiologiques (125). Cette grande capacité de protéolyse paraît être une caractéristique générale du métabolisme rénal des protéines (125). L'accumulation tubulaire de protéines dépend donc de leur absorption apicale et de leur hydrolyse (125).

2.1.1. Endocytose en phase fluide

L'endocytose en phase fluide est un processus non spécifique. Il consiste en une incorporation dans des vésicules d'endocytose de protéines telles que l'albumine présentes dans le milieu extracellulaire (Figure 2-5) (88,163). Contrairement à l'endocytose d'adsorption (vide infra), il n'y a pas de liaison de protéines à des récepteurs (Figure 2-5).

2.1.2. Endocytose d'adsorption

FIGURE 2-5 Modèle explicatif de la cinétique d'absorption de l'albumine dans le tubule proximal isolé perfusé de lapin (67).



Absorptive endocytosis responsible for low-capacity, high-affinity kinetics operating at near physiological ranges of tubular fluid albumin concentration (2-4 mg/dl). (b) Fluid (bulk-phase) endocytosis responsible for high-capacity, low-affinity kinetics operating at abnormally high ranges of tubular fluid albumin concentrations (>5 mg/dl) (L, tubular lumen; M, proximal tubule microvilli; C, cell interior; •, albumin molecule; —, binding site (unoccupied by albumin molecule); [], fluid endocytosis by bulk incorporation of albumin aggregates into endosomes. A partially formed endosome invaginating into the cell interior from the base of a microvillus is shown at the bottom of the diagram.

L'endocytose d'adsorption est le procédé le plus important pour extraire les protéines du liquide tubulaire à travers le pôle apical des cellules épithéliales (88,163). Ce procédé conduit ultimement à une hydrolyse complète de la protéine en a.a. et possiblement en petits peptides (125). L'albumine absorbée est en effet hydrolysée dans les lysosomes des cellules du TCP (88,106,127).

2.1.2.1. Passage transcellulaire de l'albumine

Le catabolisme débute à la surface apicale jusqu'à la partie baso-latérale de la cellule (125). Le processus transcellulaire est rapide, s'effectue six ou sept minutes après l'absorption à travers la membrane apicale et le temps utilisé dépend de la livraison des protéines aux lysosomes et de leur dégradation subséquente (125). La translocation de la protéine des endosomes dans les lysosomes, après fusion membranaire, ne nécessiterait pas plus que 1,5 à 3 minutes (la vitesse de migration = $0,032-0,05 \mu\text{m}/\text{sec}$ sur une distance de $5 \mu\text{m}$) (125). Pour des protéines rapidement hydrolysées, leur livraison aux lysosomes peut utiliser une part significative du temps requis pour la totalité de ce processus transcellulaire (125). A de très grandes concentrations d'albumine dans le fluide tubulaire, l'incorporation massive de ces agrégats, par endocytose en phase fluide, peut être responsable de la réabsorption d'une très grande quantité d'albumine (127). La réabsorption rapide du fluide tubulaire via le transport actif de Na^+ augmente probablement la concentration d'albumine libre à proximité des sites d'endocytose à la base des microvillosités (127). Les protéines se rassemblent alors aux sites d'endocytose, ce qui facilite le transport par les deux mécanismes décrits ci-haut (127). On croit que les deux mécanismes mènent à la dégradation lysosomiale. Cependant, une petite partie de ces protéines peut stagner dans la lumière tubulaire et ne pas participer à l'absorption quand l'albumine non liée se trouve en quantité insuffisante près des sites d'endocytose (127).

2.1.3. Cinétique de l'absorption et du catabolisme

Une détermination précise de l'étape limitante de ce métabolisme cellulaire rénal des protéines est difficile (125). Comme l'absorption d'albumine à travers la membrane apicale est relativement constante, on pense que cette étape limitante s'effectuerait lors du transfert des protéines des endosomes vers les lysosomes ou dans les lysosomes et inclurait l'hydrolyse initiale de la protéine absorbée (125). La libération des produits finaux cellulaires d'hydrolyse ne constituerait pas une étape limitante puisqu'il n'y a pas d'accumulation apparente de ces produits dans les cellules tubulaires (125).

L'absorption dépend surtout de la quantité de protéines filtrées (125). A une faible concentration d'albumine, l'état d'équilibre, c'est-à-dire vitesse d'hydrolyse intracellulaire = vitesse d'absorption, est presque accompli puisque 80 % de l'albumine absorbée sont hydrolysés (127). Les autres 20 % accumulés dans le tissu tubulaire représentent leur prise en charge par les lysosomes au début de la perfusion (127). La cinétique d'hydrolyse de l'albumine étant inconnue, il est impossible de prédire l'accumulation approximative d'albumine à de plus fortes charges perfusées de protéines. Ceci démontre que l'absorption tubulaire d'albumine doit être déterminée par la vitesse de capture des protéines du fluide tubulaire plutôt que par sa vitesse d'accumulation dans les cellules rénales (127).

2.1.4. Aspects quantitatifs de l'absorption et du catabolisme

On connaît très peu les aspects quantitatifs de l'absorption tubulaire et du catabolisme de l'albumine (126). A cause du faible coefficient de tamisage glomérulaire, les méthodes de clairance rénale sont inadéquates pour quantifier l'absorption tubulaire de cette protéine (126).

La mesure d'infimes concentrations d'albumine (en nL de filtrat glomérulaire ou fluide tubulaire) d'échantillons issus de microponction est toujours imprécise même

lorsque des techniques immunologiquement ou chimiquement très sensibles sont utilisées (126). Afin d'éviter ce problème, l'ASB (albumine sérique bovine) cristalline purifiée est, par méthylation réductrice, marquée avec du ^3H (126). Cette méthode conduit à de très grandes activités spécifiques sans affecter les activités biologiques ou physico-chimiques de la protéine (126). La manipulation tubulaire de ^3H -CH₃-albumine ne diffère pas de celle de ^{125}I -albumine, ce qui indique que la méthylation réductrice n'altère pas l'absorption tubulaire d'albumine (127). De plus, les déterminations par chromatographie sur gel et par focalisation isoélectrique ont montré l'impossibilité de différencier l'albumine marquée de celle non marquée (126). L'utilisation d'albumine marquée permet alors de déterminer avec précision son accumulation intracellulaire, son catabolisme, son transport à travers l'épithélium, ses liaisons non-spécifiques (126).

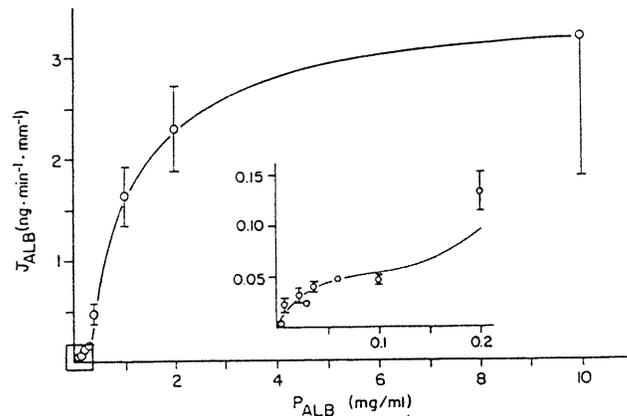
On étudie le sort de la ^3H -CH₃-albumine absorbée par des tubules perfusés avec une concentration de 0.03 mg/mL d'albumine (126). La disparition du $^3\text{CH}_3$ de la lumière tubulaire équivaut à la somme de la radioactivité apparaissant dans le bain et de celle demeurant dans le tissu tubulaire (126). La radioactivité du fluide tubulaire recueilli précipite presque complètement en présence d'acide trichloroacétique, ce qui démontre qu'il n'y a pas de radiolyse dans le fluide tubulaire (126). La protéine absorbée est catabolisée par l'épithélium tubulaire et les produits de dégradation sont libérés dans le bain de solution tubulaire (126). Etant donné qu'aucun ^3H -CH₃-albumine intact n'apparaît dans le bain de solution, le transport transcellulaire de l'albumine intacte demeure négligeable (126). Dans le modèle de rein perfusé, approximativement 20 % de l'albumine absorbée demeurent dans le tissu tubulaire à la fin de chaque perfusion, ce qui indique qu'en faible quantité, la vitesse d'hydrolyse intracellulaire de l'albumine varie avec sa vitesse de réabsorption (126). L'accumulation intra-rénale d'albumine sous-estime donc grossièrement la vitesse d'absorption réelle de la protéine (126). La vitesse de disparition du ^3H de la lumière tubulaire est cependant une bonne mesure de la vitesse d'absorption de l'albumine (126).

Pourtant, *in vivo*, ces mesures demeurent très difficiles car elles impliquent des techniques de microperfusion et de microponction. Dans de telles expériences, la possibilité d'une contamination du fluide tubulaire pauvre en albumine par le fluide extraluminal riche en albumine peut conduire à une surestimation de la concentration de cette protéine dans les échantillons de filtrat glomérulaire ou de fluide tubulaire tandis que la liaison de l'albumine aux micropipettes siliconées utilisées dans les techniques de perfusion conduit à une sous-estimation (126).

2.2. Interrelation entre le T_m d'absorption et les charges normalement filtrées de la protéine

On a étudié la cinétique d'absorption de l'albumine sur 57 TCP perfusés de lapin avec des concentrations d'albumine variant entre 0.0012 et 10 mg/mL (Figure 2-6) (126).

FIGURE 2-6 Cinétique de l'absorption de l'albumine dans les tubules contournés proximaux (127).



La capacité maximale d'absorption est atteinte à des concentrations dans le fluide tubulaire de ± 2 mg/mL (126). En plus du système à haute capacité d'absorption, il existe

un système de plus faible capacité avec une $V_{\max} = 0.064$ ng/min/mm tubule et un K_m apparent = 0.031 mg/mL (126).

Il y a une double cinétique du transport de l'albumine dans le TCP isolé et perfusé de lapin, c'est-à-dire un système à grande capacité qui sature bien au-dessus des valeurs normales et un système à plus faible capacité, à des valeurs proches de la charge normalement filtrée de cette protéine (126). Le système à forte capacité d'absorption est une caractéristique normale du processus d'absorption de l'albumine par les cellules tubulaires rénales (126). Les mécanismes exacts de cette double cinétique d'absorption ne sont pas encore totalement compris (126). Il est possible que les sites d'endocytose possèdent plus de deux sites de liaison avec des affinités différentes pour l'albumine (126). On ne peut cependant pas exclure complètement que de fortes concentrations d'albumine stimulent la vitesse de formation de vésicule d'endocytose (126). Cependant, cette possibilité semble irrecevable puisqu'il a été démontré que la capture d'inuline ne varie pas en présence de concentrations élevées d'albumine dans le fluide tubulaire (126).

2.3. Albumine cationique

Afin de pouvoir mesurer l'influence de la charge nette sur l'absorption rénale d'albumine, on compare la vitesse d'absorption de l'albumine anionique native et un dérivé cationique de l'albumine (127). A de faibles charges, la vitesse d'hydrolyse intracellulaire de l'albumine absorbée est équivalente à sa vitesse d'absorption et les produits de l'hydrolyse demeurent dans le liquide périrubulaire (127).

A de faibles concentrations, l'albumine cationique est absorbée plus rapidement que l'albumine anionique (127), ce qui confirme le fait que la charge nette est un des déterminants de la capture tubulaire de protéines (126).

La liaison de l'albumine à une surface chargée négativement de la membrane luminale joue donc un rôle dans le processus d'absorption (126). L'augmentation de l'absorption tubulaire de protéines cationiques pourrait être due à une combinaison de leur

plus grande liaison aux sites anioniques de la membrane luminale et de leur accès plus aisé aux sites d'endocytose à la base des microvillosités (127).

Avec des concentrations d'albumine cationique inférieures à 0.1 mg/mL, il y a une augmentation de la capture tubulaire de cette protéine par les tubules perfusés (Figure 2-7) (127).

Avec de plus grandes concentrations d'albumine cationique dans le fluide tubulaire c'est-à-dire 1 mg/mL, il y a plutôt une diminution de l'absorption tubulaire de cette protéine par rapport à l'albumine anionique native à la même concentration (Figure 2-7) (127). En parallèle, il y a une inhibition prononcée de la réabsorption du fluide et une dépression du fonctionnement des TCP perfusés et isolés de lapin (Figure 2-7) (127).

FIGURE 2-7 Effets des albumines anionique (ALB^{\ominus}) et cationique (ALB^{\oplus}) sur la réabsorption dans les tubules contournés proximaux (127).

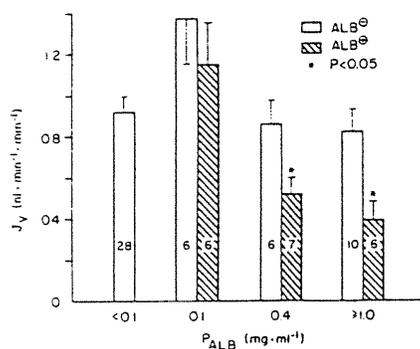


Figure 8. Effect of native anionic albumin (ALB^{\ominus}) and derivatized cationic albumin (ALB^{\oplus}) on fluid reabsorption in proximal convoluted tubules. Tubules were perfused with the indicated concentrations of albumin. Higher concentrations of ALB^{\oplus} (>0.4 mg/ml) but not ALB^{\ominus} significantly decreased J_v .

On perfuse les parties S₁ de TCP avec de l'albumine native anionique cationisée par l'activation de son COOH par la carbodiimide suivie d'une amination par de l'éthylène diamine (127). La concentration d'albumine initialement perfusée s'élève à 0.03 mg/mL (127). La concentration d'albumine dans le fluide tubulaire ne change pas significativement puisque le rapport d'albumine/nL de fluide recueilli et de perfusat

standard valant 1.02 ± 0.01 n'est pas statistiquement différent de 1.00 (127). Les cellules du TP enlèvent l'albumine du fluide tubulaire proportionnellement à la réabsorption du fluide tubulaire (127). La vitesse de formation des vésicules d'endocytose ne semble pas altérée par la présence d'albumine dans le fluide tubulaire (127). Ceci suggère que la grande capacité du système de transport de l'albumine n'est pas seulement due à la stimulation de l'endocytose par une augmentation de la concentration d'albumine dans le fluide tubulaire (127). Les effets de la charge nette d'albumine sur son absorption tissulaire peuvent être testés par perfusion d'un groupe différent de tubules avec des concentrations d'albumine cationisée variant entre 0.1 et 1.0 mg/mL (Figure 2-8) (127).

FIGURE 2-8 Effets de la charge nette sur l'absorption tubulaire d'albumine dans les tubules contournés proximaux (127).

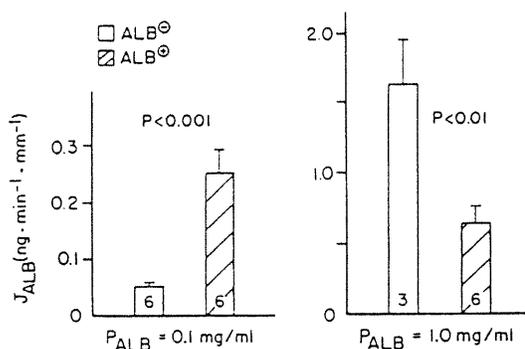


Figure 7. Effects of net charge on tubular absorption of albumin in proximal convoluted tubules. Tubules were perfused with native anionic albumin (ALB^{ominus}) or derivatized cationic albumin (ALB^{oplus}) at perfusate albumin concentrations (P_{ALB}) of 0.1 or 1.0 mg/ml. J_{ALB} are expressed as mean \pm SE and the numbers within the bars indicate the number of tubules; P = probability that the values are identical (independent t test). The low value of J_{ALB} at the higher concentration is probably due to the deleterious effect of high concentrations of cationic albumin on tubular function

Certains auteurs affirment que des concentrations élevées d'albumine cationisée altèreraient la morphologie et la fonction des structures épithéliales tubulaires et pourraient provoquer une diminution de la réabsorption du fluide tubulaire et de sa propre capture cellulaire (127). Cet effet pourrait être relié au catabolisme de cette albumine et à la libération accrue d'a.a. cationiques qui ont des effets toxiques connus sur le TCP.

2.4. Surcharge et transport intracellulaire

Quand il y a un excès d'albumine filtrée, le taux d'excrétion urinaire d'albumine est proportionnel aux quantités filtrées (127). La vitesse d'absorption tubulaire continuera d'augmenter avec l'augmentation de l'albumine filtrée (127). Dans des protéinuries graves, une augmentation de l'albumine filtrée peut conduire à une albuminurie bien avant que la saturation de la capture tubulaire de l'albumine ne soit atteinte et cette albuminurie peut s'accompagner d'une augmentation du catabolisme rénal d'albumine et d'un dépôt de gouttelettes d'albumine absorbées par les cellules tubulaires rénales (127). L'augmentation secondaire du catabolisme rénal de l'albumine peut contribuer au "turn-over" plasmatique accéléré de cette protéine et conséquemment, conduire à l'hypoalbuminémie du syndrome néphrotique (126).

L'absorption tubulaire d'albumine présente à des concentrations luminales élevées peut être particulièrement sensible aux débits du flux tubulaire et à la réabsorption de fluide (126). Ces deux paramètres peuvent être altérés dans les maladies rénales (126). Le catabolisme rénal de l'albumine absorbée dépend non seulement de la nature de la protéine et de sa vitesse d'absorption tubulaire mais également du maintien d'un pH intra-lysosomal acide (126). A un pH intra-lysosomal élevé, une déficience de l'hydrolyse de la protéine peut se produire si la perméabilité de la membrane lysosomiale aux protons s'accroît et/ou si la quantité d'énergie fournie à la pompe à protons est restreinte (126). Une protéinurie tubulaire peut donc se produire même en présence d'une charge filtrée inchangée.

2.5. Variation de l'absorption de l'albumine avec l'âge

On a étudié le transport rénal d'albumine chez des rats âgés de 3 ou de 24 mois. La protéinurie était significativement plus élevée (13.29 ± 5.25 mg/j/100 g) chez les rats de 24 mois que chez ceux de 3 mois (1.23 ± 0.55 mg/j/100 g) (32). L'excrétion totale de

protéines décuple donc avec l'âge (32). L'électrophorèse a montré que la protéinurie était sélective (32): la microalbuminurie ne s'accompagne pas d'une fuite appréciable d'autres protéines de faible P.M., suggérant que l'endocytose médiée par un récepteur est moins affectée que l'altération glomérulaire liée à l'âge (32). Le pH n'a pas d'effets sur la liaison de l'albumine à des vésicules de la bordure en brosse dont la composition lipidique ne change pas avec l'âge quoiqu'il existe deux maxima à pH=5 et à pH=7.4 chez les deux types de rats (32). Le pH n'influencait pas la liaison de l'albumine (^{125}I -ASH) (albumine sérique humaine) à des vésicules de MBB chez les deux catégories de rats à des valeurs de pH oscillant entre 4.5 et 9.0 (32). Par contre, la capacité de liaison des vésicules de MBB différait chez ces deux groupes (32). Elle équivaut à 380.27 ± 178.36 pM sites de liaison/mg protéines membranaires chez les jeunes rats et à 236.84 ± 97.50 chez les plus vieux (32). L'indice d'efficacité d'endocytose d'adsorption (N/Km) s'élève à 0.782 ± 0.238 chez les jeunes rats et à 0.547 ± 0.199 chez les autres (32). Avec l'âge, la réduction du nombre de récepteurs déterminerait une diminution significative du contenu protéique de la bordure en brosse (32). Par contre, ces récepteurs ne subissent pas d'altérations structurales qui puissent affecter la liaison ligand-récepteur (32). La diminution du N/Km est en rapport avec la composition de la bordure en brosse rénale (32). L'albuminurie pourrait être provoquée également par les changements structuraux couramment rencontrés dans l'albumine (dûs à la glycation) qui influencent sa charge et sa conformation (32).

2.6. Mécanismes cellulaires de l'endocytose

2.6.1. Transport luminal de l'albumine

Les groupements chargés positivement (amino ou guanidino) des protéines se lient à des récepteurs spécifiques situés au pôle luminal des cellules du TP chargées négativement (106), créant une concentration de protéines dans les régions tapissées de

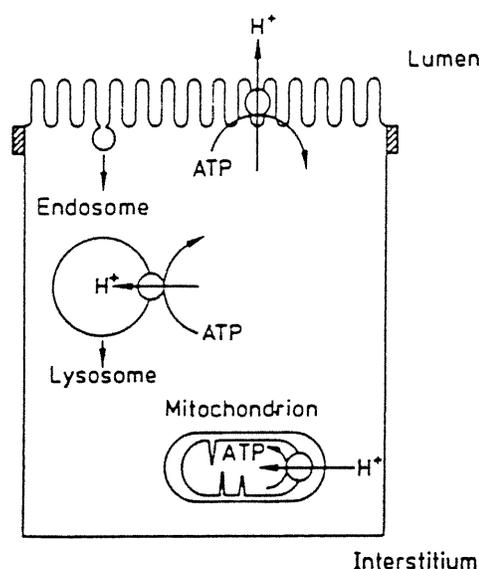
clathrine de la membrane localisées à la base des microvillosités (104) et la formation de complexes ligand-récepteur dans ces régions (88,163). La clathrine est une protéine du cytosquelette capable de s'auto-assembler, avec d'autres protéines d'enveloppement, et joue un rôle dans la liaison sélective des complexes ligand-récepteur destinés à l'internalisation (57). Les protéines possédant la même charge nette mais opposées par la charge (anionique ou cationique) compétitionnent pour l'absorption (104). Ces vésicules sont des intermédiaires de courte durée et, après internalisation, sous l'effet d'une ATPase cytoplasmique, leurs enveloppes de clathrine s'éliminent rapidement (57,63), générant un système de vésicules à membrane lisse (endosomes) à l'intérieur des tubules (88,163). L'invagination des régions d'endocytose (puits tapissés) de la membrane cellulaire contenant les protéines adsorbées se transforment en vésicules de pinocytose recouvertes d'un manteau de clathrine et constituent le premier compartiment d'endocytose (57,63). Il y a fusion de ces vésicules pour former les vacuoles d'endocytose secondaire ou endosomes (0.2-1 μm de diamètre) (63).

2.6.1.1. Fonctions des endosomes

Les endosomes servent à concentrer les molécules internalisées et à les transférer vers de plus grandes structures vésiculaires qui possèdent souvent des extensions tubulaires complexes (les lysosomes) (57,163). Ils ne possèdent pas d'activité enzymatique lysosomiale cytochimiquement démontrable (hydrolases acides) et, tout comme les lysosomes (63), ont un très bas pH intra-vésiculaire (88,163). Cependant, nous avons trouvé que l'albumine commençait déjà à se dégrader dans les endosomes et il serait intéressant d'étudier si le mécanisme s'effectue via une cathepsine D (51,108,110) tout comme pour le PTH (38). Ils ont aussi une relativement basse densité, sont marqués par des marqueurs de pinocytose plus rapidement et bien avant le marquage des lysosomes, les macromolécules internalisées résident transitoirement dans les endosomes alors que les lysosomes sont les organelles à destination finale des macromolécules (63).

La membrane des endosomes possède une H^+ -ATPase parce qu'initialement, cette pompe est un constituant de la membrane cellulaire et serait internalisée pendant l'endocytose ou la pinocytose comme beaucoup d'autres protéines membranaires, telles que des échangeurs et pompes de la MBB (Figure 2-9) (63).

FIGURE 2-9 Systèmes de transport de protons dans les cellules du tubule proximal (90).



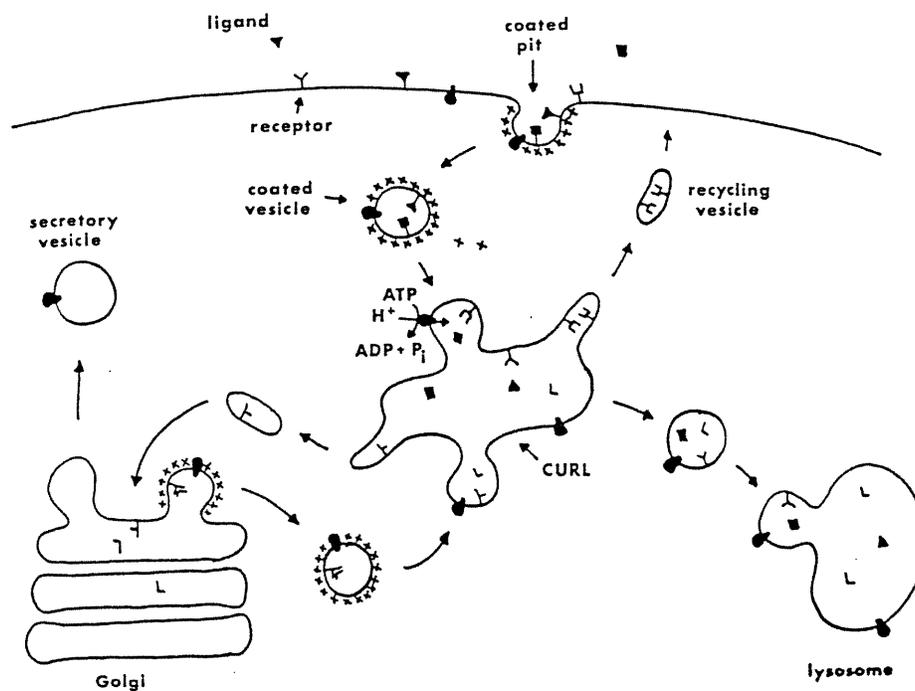
La diminution du pH dans les endosomes et des lysosomes est produite, en outre, par la présence de pompes à protons dépendant de l'ATP (57).

Parmi les mécanismes de contrôle employés par la cellule pour contrôler le pH de nombreux compartiments intracellulaires, citons la variation de la densité des pompes (57). Plus l'activité de transport est grande, plus le nombre de pompes augmente (57). Ce type de trafic membranaire est utilisé dans les membranes lumineales des cellules épithéliales de rein et de la vessie (57).

2.6.1.2. Dissociation du récepteur et de l'albumine dans les endosomes

Quoique le récepteur et le ligand demeurent associés dans des vésicules tapissées comme dans les petites vésicules endosomiales non tapissées, la dissociation s'effectue lorsque les complexes sont libérés des plus grandes structures endosomiales ou CURL (Compartment of Uncoupling of Receptor and Ligand), ce qui implique que les vésicules tapissées provenant de l'endocytose ne s'acidifieraient pas immédiatement (Figure 2-10) (57). L'étape de dissociation se produit dans les endosomes et est influencée par la dépendance au pH du complexe récepteur-ligand (88,163). Le signal qui active la dissociation du complexe est son exposition à un pH acide (57).

FIGURE 2-10 Fonctions de l'acidification vacuolaire dans les cellules animales (57).



Les enzymes lysosomiales se dissocient de leurs récepteurs à un pH de 5.5- 6.5 (57). Parmi les étapes qui peuvent dépendre d'un bas pH, figurent la fusion entre deux compartiments endosomiaux, le rassemblement des récepteurs non liés dans les

extensions tubulaires impliquées dans le recyclage du récepteur, le bourgeonnement de ces extensions tubulaires du compartiment endosomal, ou la fusion des vésicules de recyclage contenant des récepteurs avec la membrane (Figure 2-10) (57).

Le CURL est un compartiment tubulo-vésiculaire dans lequel le ligand dissocié apparaît dans l'espace endocytotique alors que le récepteur inoccupé apparaît dans les extensions tubulaires qui sont considérées comme des intermédiaires du recyclage de récepteurs à la surface cellulaire (Figure 2-10) (57).

2.6.1.3. Dégradation de l'albumine dans les lysosomes

La dernière étape de l'endocytose de l'albumine consiste en la fusion des endosomes avec les lysosomes (88,106,163). Les mécanismes exacts de cette fusion sont inconnus (88,163).

Les ligands internalisés aptes à la dégradation apparaissent dans les lysosomes après 20 à 40 minutes (57). La protéine absorbée est complètement hydrolysée dans les phagolysosomes à pH acide = 4-5 (30,104,163) par des hydrolases acides. Les a.a., produits de la dégradation, retournent dans la circulation par le côté baso-latéral de la cellule (106) et de petites quantités, du côté luminal vers l'urine (104,126). La membrane des lysosomes est donc perméable aux dipeptides et possède un système de transport des a.a. permettant leur sortie (125). Les dipeptides qui s'échappent de ces lysosomes peuvent être hydrolysés par des hydrolases peptidiques cytoplasmiques (125). Bien que des transporteurs d'a.a. soient présents dans la membrane baso-latérale, la présence d'un transporteur peptidique dans cette membrane doit encore être démontrée (125). Le résultat net est donc le relargage par le pôle baso-latéral d'une fraction importante des a.a. des protéines qui n'ont pas été localement catabolisés. L'hydrolyse lysosomiale est, tout comme l'endocytose, un processus à grande capacité. Les protéines absorbées ne s'accumulent pas facilement dans les cellules du TP. La vitesse de l'hydrolyse dépend de la nature de la protéine et de sa résistance aux hydrolases acides lysosomiales. A l'état

stable, l'hydrolyse contrebalance la capture par endocytose. Autrement, il pourrait y avoir une accumulation infinie de protéines dans les cellules (104).

2.6.1.3.1. Protéinases acides

Après l'endocytose, les protéines de plus grand P.M. sont dégradées dans les lysosomes secondaires nouvellement formés par des protéinases des cellules du TCP (10). Les protéinases lysosomiales hautement actives sont les cathepsines B et L (122). Les enzymes lysosomiales se trouvent normalement dans un état latent et sont séparées de leurs substrats présents dans le milieu intracellulaire par la membrane lysosomiale et seule une petite fraction se trouve sous forme libre (13).

Les altérations de la fonction lysosomiale ou une diminution de la vitesse de fusion des endosomes aux lysosomes peut ralentir le catabolisme des protéines absorbées (30). Les différences observées dans les vitesses de catabolisme de toutes les protéines absorbées proviennent de la variabilité de leur résistance à l'action hydrolytique des enzymes lysosomiales (30).

Les lysosomes s'activent et relâchent leurs enzymes qui, de latents, deviennent actives dans les conditions de catabolisme pour dégrader les composants cellulaires (autophagie) ou lors de l'accumulation tissulaire d'une macromolécule qui est dégradable par les enzymes lysosomiales (13). Cette activation est souvent non-spécifique et affecte la totalité ou la majorité des enzymes contenues dans les lysosomes (13).

2.6.1.3.1.1. Fucosidase et phosphatase acide

Les enzymes lysosomiales fucosidase et phosphatase acide ne sont pas impliquées dans la digestion des protéines et leur activité dans les TP ne change pas lors d'une augmentation de la charge protéique au niveau du TP (121). L'activité spécifique de l' α -fucosidase tubulaire, une enzyme lysosomiale non-protéolytique, est diminuée (10).

2.6.1.3.1.2. Cathepsines tissulaires

i) Généralités

Le rein de rat normal contient des protéinases à cystéine et à aspartate très actives (10). La dégradation maximale de l'albumine s'obtient à un pH de 3.5 à 4.2 (10). Comme ce pH est inférieur à celui des vacuoles lysosomiales *in vivo* (pH 5.0 à 6.5), un pH de 5.0 conduira à une dégradation de l'albumine à 70 % de sa valeur maximale (10). L'albumine maintient sa conformation native à des valeurs de pH oscillant entre 5 et 9 (10). L'activité spécifique de la cathepsine B monte à 368 unités/ μ mole et à 1700 unités/ μ mole pour la cathepsine L (9). Ces deux cathepsines sont des dimères liés par des ponts S-S et sont composés d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère (9).

Chez des animaux diabétiques, la présence éventuelle d'une protéinurie, d'une hypertrophie rénale *per se*, la présence de leur diabète insulino-dépendant, l'utilisation de la streptozotocine pour développer ce diabète sont des facteurs qui peuvent expliquer la diminution des activités de cathepsines (122).

ii) Implication des enzymes lysosomiales dans différents tissus

Chez les diabétiques, les tissus répondent au diabète de différentes façons : dans le foie, la réponse est de type catabolique alors que dans le rein, la réponse est de type anabolique; les enzymes lysosomiales présentes, notamment dans les cellules rénales, diminuent avec le diabète (13). Dans le diabète, plusieurs voies anaboliques (glycogénèse, synthèse de protéines et de glycoprotéines) et leurs enzymes montrent une augmentation de l'activité rénale par rapport à l'activité hépatique (13).

iii) Cathepsine D

L'activité de la cathepsine D double dans une fraction tubulaire issue de reins de rats atteints d'un syndrome néphrotique induit par la puromycine (10). La puromycine produit une protéinurie marquée et donc une augmentation du catabolisme de l'albumine filtrée par les reins (10). L'augmentation de l'activité de la cathepsine D coïncide avec le début de la protéinurie (10). Cependant, d'autres auteurs montrent qu'il y a une diminution de l'activité de la cathepsine D dans les homogénats de cortex rénal d'animaux diabétiques (122).

iv) Cathepsine H

Contrairement aux cathepsines B et L, la cathepsine H possède peu d'activité protéolytique (10). La cathepsine H ne contribue pas significativement à la dégradation tubulaire de l'albumine dans des conditions normales (10).

v) Cathepsines B et L

Les protéinases à cystéine jouent un rôle important dans la dégradation de l'albumine par les lysosomes corticaux rénaux (10). En effet, les cathepsines B et L représentent le système enzymatique majoritaire impliqué dans le "turn-over" des protéines intracellulaires ainsi que dans la digestion des protéines qui sont réabsorbées par endocytose de l'ultrafiltrat glomérulaire (121). De plus, l'équilibre entre la capture protéique, l'activité et la spécificité de ces cathepsines peut être un facteur important pour comprendre la physiopathologie des dommages tubulaires provoqués par l'hémoglobine, la myoglobine, le lysozyme, les protéines Bence-Jones ou de la surcharge protéique retrouvée dans le syndrome néphrotique (121).

La cathepsine L rénale humaine est une puissante protéinase utile à la dégradation des MBG (9). La capacité de la cathepsine L à dégrader la MBG combinée à la grande activité de la cathepsine L dans les glomérules suggère que cette enzyme peut participer à la phase lysosomiale du "turn-over" de la MBG in vivo (9). La MBG ne se dégrade pas à des valeurs de pH supérieures à 6.0, ce qui implique que la cathepsine L ne participerait pas à la dégradation extracellulaire de la MBG qui, normalement, pourrait se produire à un pH avoisinant 7.0 (9). Cependant, la capacité des cellules viables à relâcher des formes actives de cathepsine L et à acidifier de petites quantités de leur microenvironnement extracellulaire pourrait augmenter la possibilité de la cathepsine L à participer à la dégradation extracellulaire de la MBG qui serait associée à un "turn-over" normal pour la MBG ou à des états pathologiques tels qu'une glomérulonéphrite (9).

Détermination de l'activité des cathepsines

Les activités des cathepsines B et L peuvent se mesurer sur des segments isolés de néphron (10). Le N-CBZ-L-Phe-Arg-7-amido-4-méthylcoumarine est utilisé comme substrat pour la combinaison des activités des cathepsines B et L et le N-CBZ-L-Arg-Arg-7-amino-4-méthylcoumarine pour l'activité de la cathepsine B (121). Ces enzymes clivent le COOH de l'Arg et du 7-amino-4-méthylcoumarine est libéré (121). Ce composé est très fluorescent et peut se mesurer à de très petites concentrations dans de petits volumes (121). Des tranches de rein sont incubées avec de la collagénase pour faciliter la dissection des segments tubulaires (121). Le traitement à la collagénase n'affecte pas les activités des cathepsines (121). Chaque type de segments (S₁, S₂, S₃, AH...) est solubilisé, incubé pendant 30 min à 37° (121). La réaction enzymatique est arrêtée en plaçant les fioles sur de la glace et en ajoutant de l'iodoacétate (121). Finalement, la fluorescence est déterminée (121).

Les plus grandes activités des cathepsines sont trouvées dans le premier millimètre du TCP (121). Chez des rats normaux, entre 60 et 70 % des protéines filtrées sont également réabsorbés dans le TCP (121).

Hypertrophie rénale et cathepsines

Une étude porte sur des reins de rats témoins, de rats devenus diabétiques par un traitement à la streptozotocine et d'autres traités à la streptozotocine et à l'insuline (122). L'hypertrophie rénale chez les rats traités à la streptozotocine est arrêtée par un traitement insulinique (122). Les changements d'activité des cathepsines B et L probablement induits par une hypertrophie sont mesurés dans des reins de rats après une néphrectomie unilatérale (122). Les changements métaboliques et/ou fonctionnels rapportés au début du diabète pourraient être responsables de la diminution des activités des cathepsines dans les segments du TP (122). On peut penser que les diminutions des activités des cathepsines participent au développement de l'hypertrophie rénale parce qu'elles sont réduites dans le TP et l'hypertrophie produite par le diabète implique le TP (122). L'hypertrophie rénale s'accompagne d'une diminution des activités des cathepsines B et L dans S₂ et S₃ après quatre jours et dans S₁ et S₂ après 10 jours de diabète (122). Une cellule rénale peut contenir 100 mg de protéines et 100 unités de cathepsine (122). L'activité enzymatique pourrait s'élever à 1 U/mg (122). Une diminution de l'activité des cathepsines entraînant une diminution de la dégradation des protéines cellulaires pourrait donc être un mécanisme qui économise de l'énergie afin d'augmenter la masse protéique rénale (122). La cathepsine ne diminue pas dans les reins de rats qui ont reçu de la streptozotocine et qui sont traités à l'insuline, ce qui exclut la streptozotocine comme facteur causal (122). Les activités normales des cathepsines dans les segments de TP de rats diabétiques depuis six mois avec une hypertrophie rénale marquée réfutent l'hypertrophie rénale comme facteur causant une diminution de l'activité des cathepsines (122).

Le poids des reins chez les rats diabétiques augmente de 17 % après quatre jours puis de 56 % six mois après le traitement à la streptozotocine par rapport aux valeurs obtenues chez les rats témoins (122). De plus, il est possible qu'une diminution globale des activités de ces enzymes au début du diabète ne dépende pas de l'hypertrophie de l'organe parce qu'il y a une augmentation des activités des cathepsines B et L hépatiques ainsi qu'une diminution du poids du foie (122). On rapporte aussi une diminution du contenu en protéines et une augmentation des vitesses de dégradation dans le foie, le muscle et le coeur de rats diabétiques (122). Cette diminution des activités des cathepsines avec une augmentation concomitante de la masse de protéines s'observe seulement chez les rats diabétiques (122).

Le traitement à l'insuline de rats devenus diabétiques avec la streptozotocine empêche l'hypertrophie rénale et la diminution de cathepsines (122).

La longueur du TP augmente dans le diabète (122). Il se pourrait que l'activité réelle de la cathepsine ne change pas et que l'activité mesurée diminue à cause de la dilution des enzymes dans un tubule plus long (122). Cette probabilité est exclue parce que l'hypertrophie compensatoire rénale d'amplitude et de durée similaires après une néphrectomie unilatérale ne montre pas de diminution des activités des cathepsines (122).

Les concentrations sériques d'a.a. (BCAA) tels que la leucine, l'isoleucine et la valine, augmentent au début du diabète et à proximité du TP, induisant une augmentation de leur concentration et de leur capture par les cellules tubulaires (122). La leucine étant un puissant inhibiteur de la dégradation des protéines dans le muscle et le foie, l'augmentation de sa capture peut inhiber la dégradation des protéines dans les cellules du TP et de ce fait, contribuer au développement de l'hypertrophie rénale chez le diabétique (122).

Éléments affectant la stimulation des cathepsines B et L au cours des états protéinuriques

Plusieurs facteurs -tels que la taille et la charge des protéines, la protéine en soi, les changements structuraux des lysosomes induits par la capture et le stockage des macromolécules dans les lysosomes- peuvent possiblement déclencher la stimulation des cathepsines B et L lors d'une protéinurie glomérulaire (10).

Taille et charge des protéines

La taille des protéines variant entre 12 et 60 kDa induit la même augmentation des activités des cathepsines B et L dans le TP (121).

La charge de la protéine affecte sa vitesse de capture au niveau du TP et pourrait donc indirectement affecter l'importance de la stimulation des cathepsines (121). La stimulation directe intra-lysosomiale des cathepsines B et L semble être indépendante de la charge moléculaire (121).

Protéine en soi

La protéine en soi ne semble pas être un déclencheur puisqu'une élévation des activités des cathepsines dans le TP se produit après une injection de dextran neutre présentant un P.M. moyen de 20 kDa (121). Le dextran qui sert de macromolécule non protéinique est filtré par le glomérule, endocyté par les cellules du TP et transféré dans les lysosomes (121). On peut conclure que la capture endocytotique ou le stockage lysosomal des macromolécules ou les deux peuvent déclencher la stimulation des cathepsines plutôt qu'une interaction directe protéine-enzyme (121). L'activation des pro-pré-cathepsines et pré-cathepsines peut être impliquée dans l'augmentation de l'activité plutôt que dans une synthèse *de novo* de cathepsines (121).

Conséquences de la stimulation des cathepsines pendant la protéinurie

Les lysosomes des TP sont autophages et hétérophages et les médiateurs de ces fonctions sont les cathepsines (121). La stimulation de l'hétérophagie i.e. l'augmentation de la capture et de la dégradation des protéines filtrées dans les états protéinuriques peuvent affecter l'autophagie lysosomiale (121). L'augmentation des activités des cathepsines B et L lors de la protéinurie permet d'augmenter le catabolisme des protéines intracellulaires (121). Une augmentation de la vitesse d'autophagie peut détruire d'importantes protéines structurales et fonctionnelles de la cellule sans augmentation concomitante de la synthèse de ces protéines (121).

On peut concevoir qu'une rupture lysosomiale puisse être provoquée par une surcharge de protéines (121). Les cathepsines et autres enzymes hydrolytiques intra-lysosomiaux pourraient alors directement entrer en contact avec les protéines cellulaires conduisant à une dégradation non contrôlée des composants cellulaires (121).

2.6.1.3.1.3. Cathepsines urinaires

Généralités

L'activité des enzymes NAG, β -glucuronidase, γ -glutamyl transférase (γ -GT), phosphatase alcaline, lactate déshydrogénase a été étudiée chez des patients diabétiques présentant ou non une protéinurie (50).

Les patients sans signe clinique de néphropathie diabétique montrent une augmentation significative de l'excrétion d'enzymes lysosomiales du TP (NAG et β -glucuronidase) (50,147). Une élévation concomitante de l'excrétion de NAG, β -glucuronidase, γ -glutamyl transférase, phosphatase alcaline est observée dans 50 % des cas (50). Les patients avec néphropathie montrent une augmentation de l'excrétion de

toutes les enzymes pré-citées (50,147). Il n'y a donc pas de différence d'activité de NAG chez les patients avec et sans néphropathie (113).

La protéinurie totale consiste en albumine, α_1 -glycoprotéine acide et autres protéines de faible P.M. et indique que les protéines s'échappent du glomérule et/ou sont mal réabsorbées par le TP (147). Le NAG et la β_2 -microglobuline urinaires, la protéinurie totale et le NAG sérique chez les diabétiques insulino-dépendants sans rétinopathie ni macroalbuminurie sont déterminés simultanément de même que l'interrelation existant entre ces paramètres et le contrôle du glucose sanguin et d'autres facteurs (147).

En microscopie électronique, des changements sont observés dans les glomérules et tubules (50). Ces changements morphologiques confirment l'importance diagnostique de l'excrétion élevée de NAG, β -glucuronidase et de phosphatase alcaline et de leur qualité de marqueurs de l'étape préclinique de la néphropathie diabétique (50).

Les activités des enzymes urinaires (NAG, phosphatase alcaline, leucine aminopeptidase, γ -glutamyl transpeptidase) sont déterminées par spectrophotométrie, méthodes de Tuppy et Orłowski chez des diabétiques (113). Il existe des corrélations entre la phosphatase alcaline, la leucine aminopeptidase et γ -glutamyl transpeptidase (113). Par contre, il n'y a aucune corrélation entre la NAG et les trois autres enzymes (113). Le NAG pourrait refléter la dysfonction lysosomiale des cellules épithéliales glomérulaires et du TP qui peut être causée par un mauvais contrôle glycémique (113).

NAG et albuminurie

L'évaluation de l'activité de la NAG et de l'albuminurie sérique et urinaire, pendant huit ans, chez des diabétiques insulino-dépendants montre qu'il y a une corrélation positive entre l'activité de NAG sérique et l'hémoglobine glyquée (147).

L'albuminurie est en corrélation avec l'activité du NAG mais pas avec l'excrétion de α_1 -microglobuline (79). La mesure de NAG et de α_1 -microglobuline qui sont considérés comme des marqueurs de la dysfonction tubulaire peut donner des

informations diagnostiques additionnelles sur le type et le degré de gravité de la néphropathie diabétique (79).

NAG et protéinurie

Les corrélations sont significatives entre le NAG urinaire ou la β_2 -microglobuline urinaire et la protéinurie totale et entre les NAG sérique et urinaire (147). Le NAG urinaire et la protéinurie totale augmentent chez les diabétiques insulino-dépendants par rapport aux patients témoins (147). Ces anomalies urinaires ne sont pas liées à la durée du diabète ni à une hémoglobine glycosylée stable et ne reflèteraient pas la maladie organique rénale mais plutôt les altérations fonctionnelles du tubule et du glomérule (147). Le NAG urinaire serait en relation avec HbA_{1c} c'est-à-dire avec le contrôle glycémique à long terme (147). Il augmente dans les 12 heures qui suivent l'induction du diabète par la streptozotocine chez le rat et diminue 25 heures après la normalisation de la glycémie par un pancréas artificiel (147). Il peut changer même avec des altérations à court terme de la glycémie (147). Dans le diabète, les TP sont exposés à une concentration élevée de glucose et pourraient sécréter plus de NAG dans l'urine (147). L'augmentation du NAG urinaire pourrait être liée à des problèmes tubulaires déjà présents (changements des propriétés de la membrane basale tubulaire, glycation de NAG) (147).

2.6.1.3.2. Inhibiteurs des protéinases

L'inhibition des cathepsines inhibe la dégradation intracellulaire de protéines jusqu'à 70 % (122).

Protéinases à sérine et à cystéine

Le PMSF, un inhibiteur des protéases à sérine a peu d'effet sur la dégradation de l'albumine, ce qui implique que les protéinases à sérine n'y jouent pas un rôle important (10).

Le N-éthylmaléimide et la leupeptine, inhibiteurs de protéinases à cystéine, produisent cependant une inhibition significative de la dégradation de l'albumine (10). Cet effet peut être lié à l'inhibition de l'activité des H⁺-ATPases par la N-éthylmaléimide.

Protéinases à aspartate

La pepstatine, un inhibiteur spécifique des protéinases à aspartate, inhibe la dégradation de l'albumine à 50 % (10).

L'inhibition de la dégradation de l'albumine par la pepstatine montre une grande activité de la cathepsine D dans les tubules corticaux rénaux, ce qui suggère que la cathepsine D est la protéinase à aspartate responsable de la dégradation tubulaire rénale d'albumine (10).

La combinaison d'inhibiteurs des protéinases à cystéine et à aspartate produit une inhibition presque complète de la dégradation de l'albumine (10). Les tubules possèdent des activités élevées de cathepsines B, H et L (10).

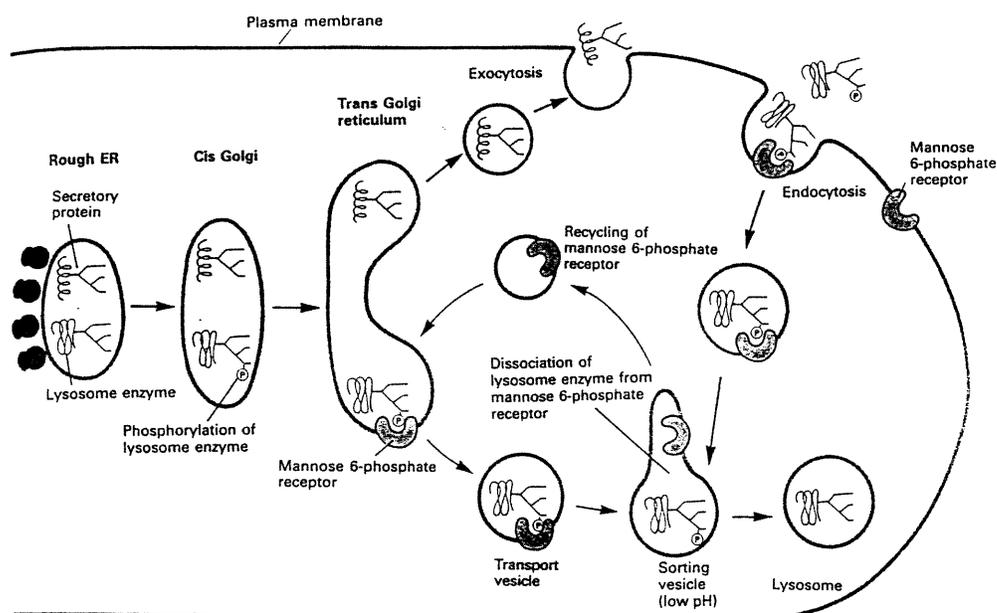
Métalloprotéinases

L'éthylènediamine acétate (EDTA), un inhibiteur de métalloprotéinases, stimule la dégradation de l'albumine (10).

2.6.1.4. Recyclage du ligand et de la membrane endosomiale

Après l'endocytose, il y a un recyclage membranaire par un échange de composés membranaires entre la surface cellulaire et un pool interne de membranes (Figure 2-10) (163). Le récepteur libéré de son ligand peut se diriger dans plusieurs voies différentes (Figure 2-10) (163). Il peut soit retourner à la surface cellulaire, soit être utilisé dans les voies lysosomiale et non-lysosomiale (Figure 2-10) (163). La membrane est recyclée à partir de macrophages/phagolysosomes pour reformer la portion de membrane cellulaire enlevée pendant l'endocytose (Figure 2-10) (163). Ceci suggèrerait que les récepteurs libres pourraient se réinsérer dans la membrane plasmique après avoir transporté leur ligand dans la cellule (163) sans s'exposer à l'environnement protéolytique du lysosome (63).

L'acidification des compartiments vacuolaires joue un rôle important dans le trafic membranaire intracellulaire (livraison d'enzymes lysosomiales fraîchement synthétisées du Golgi vers les lysosomes) (Figure 2-10) (57). L'arrivée d'enzymes lysosomiales fraîchement synthétisées dans le trans-Golgi se produit via le système de récepteur mannose-6P (Figure 2-11) (57). Ce récepteur localisé dans le réseau membranaire du trans-Golgi lie les enzymes lysosomiales via le marqueur de reconnaissance mannose-6P qui est spécifiquement ajouté à ces protéines pendant le passage à travers le Golgi (Figure 2-11) (57). Après le regroupement de ces complexes dans les régions tapissées de clathrine de la membrane du trans-Golgi et après leur concentration dans les vésicules tapissées, la libération des ligands du récepteur mannose-6P se produit à pH acide, permettant au récepteur d'être recyclé vers le trans-Golgi et de se réinsérer dans la membrane afin de lier d'autres ligands (Figure 2-11) (57).

FIGURE 2-11 Ciblage d'enzymes vers les lysosomes (48).

2.6.1.5. Effet du pH lysosomal

Dans des conditions normales, les protéines filtrées sont rapidement absorbées et hydrolysées par le rein et, de ce fait, les protéines ne s'accumulent pas dans les cellules (30,125).

Sous conditions pathologiques (une augmentation de la perméabilité glomérulaire ou de la concentration plasmatique de LMWP (protéine de faible poids moléculaire), administration de protéines exogènes), où il y a une hyperfiltration marquée de l'albumine, un déséquilibre à long terme entre l'absorption et l'hydrolyse peut conduire à un dépôt protéique dans les cellules tubulaires rénales sous forme de gouttelettes d'absorption (30,106,125). Ceci peut s'expliquer par une simple augmentation des vitesses de capture des protéines (30). La concentration des protéines dans les lysosomes doit augmenter en fonction de l'augmentation des quantités filtrées pour maintenir un état stable entre l'absorption et l'hydrolyse (30). Une surcharge protéique chronique rénale stimule les activités lysosomiales protéasiques du TP, ce qui atténuerait l'accumulation

tubulaire de protéines (125). Une augmentation de l'absorption peut cependant excéder la capacité d'hydrolyse (125).

Plus la résistance de la protéine absorbée est grande face aux enzymes lysosomiales, plus élevée doit être sa concentration intra-lysosomiale pour maintenir cet état d'équilibre (30). Les protéines plus résistantes aux enzymes lysosomiales tendront à former des dépôts plus rapidement dans les cellules rénales selon l'augmentation de la quantité filtrée de protéines (30). Les dépôts peuvent être amplifiés ou même se produire lorsque des quantités normales de protéines sont filtrées si le pH lysosomal est anormalement élevé (30). Les conditions qui peuvent conduire à une diminution de la réserve énergétique de la pompe à protons lysosomiale et/ou à une augmentation de la perméabilité de la membrane lysosomiale aux protons (anoxie) peuvent favoriser le dépôt de gouttelettes de protéines d'absorption dans les cellules tubulaires rénales (30).

2.6.2. Transport baso-latéral de l'albumine

Des études faites sur la membrane basale de tubules de reins de lapin isolés perfusés proposent que cette structure soit modérément perméable à l'albumine, ce qui suggère que l'albumine interstitielle peut être en contact avec les membranes basales des tubules (21). La mesure quantitative de la capture contra-luminale de ^{125}I -albumine sérique par des tubules rénaux isolés perfusés de lapin démontre qu'il n'y a aucune accumulation significative (21). L'accumulation d'albumine intracellulaire se produit à la face luminale des segments contourné et droit proximaux (endocytose prédominante) mais est absente dans les cellules du tubule collecteur cortical (absence d'endocytose) (21). Au niveau des cellules du TP, du tubule collecteur et de la branche ascendante large de l'anse de Henle, l'endocytose est minimale voire absente du côté pérítubulaire des cellules de chacun de ces segments (21). Il est suggéré que l'endocytose est le mécanisme le plus important par lequel les grosses protéines entrent dans les cellules épithéliales tubulaires et que l'absence de capture de l'albumine sérique contra-luminale est en corrélation avec l'absence d'un

mécanisme d'endocytose du côté péritubulaire des cellules tubulaires rénales (21). Cependant, selon Bentzel, il y aurait aussi une entrée rapide de grosses protéines et d'albumine dans la membrane contra-latérale des cellules tubulaires rénales (21). Nos expériences confirment les données de Bentzel (21). Dans notre laboratoire, après avoir fait une injection intra-péritonéale à des rats de 20 mg/kg de BE dilués dans 5 mL de NaCl 0.9 %, il y a déjà le lendemain de l'injection une coloration bleutée de la queue, des yeux, des oreilles qui se maximalise après 48 h. Après avoir sacrifié l'animal, la dissection des organes situés dans la cavité abdominale montre que les reins présentent une coloration bleue. Par la technique de microscopie à fluorescence, on remarque que les tubules corticaux proximaux présentent d'intenses petits points rouges (BE) amassés non seulement au voisinage de la paroi luminale des tubules mais également près de la membrane baso-latérale, et ce, en plus grande quantité. En s'orientant dans le cortex profond puis dans la médulla, nous avons remarqué une diminution très importante de la fluorescence mais quelques petits grains présents dans les tubules distaux suggèrent aussi un transport baso-latéral. Dans certains glomérules, organelles responsables de la filtration, se retrouvent ces petits points rouges (BE). Les vaisseaux rénaux apparaissent intensément fluorescents à cause de la liaison du BE aux nombreuses protéines de la paroi. L'albumine se liant facilement et rapidement au BE, il n'est pas impossible qu'une partie des points rouges soient formés de complexes d'albumine et d'immunoglobulines et de BE, ce qui conforterait évidemment la théorie émise par Bentzel.

2.7. Méthodes de mesure de l'endocytose

Parmi les méthodes utilisées jusqu'à présent pour étudier l'endocytose de polypeptides, protéines et macromolécules dans les cellules du TP, citons: les techniques morphologiques (histochimie, immunologie, autoradiographie de la protéine absorbée par microscopies photonique et électronique), la centrifugation différentielle (isoler les organelles impliquées dans le transport intracellulaire et le métabolisme des protéines

absorbées), les techniques de clairance chez l'animal intact (études des vitesses de capture des LMWP et polypeptides), les techniques biochimiques et de clairance dans des préparations de rein de rat isolé perfusé (détermination de l'endocytose et de l'hydrolyse lysosomiale des protéines absorbées), micro-ponctions et -perfusions de rein de rat in vivo et finalement de la microperfusion de segments isolés de TP (104).

2.7.1. Fluorescence et microscopie électronique

2.7.1.1. Transport d'albumine-FITC par des cellules rénales d'opossum

On utilise la lignée cellulaire de reins d'opossum (OK) à cause de ses ressemblances (propriétés électriques, transport membranaire) avec l'épithélium de TP (141). Tous deux possèdent les voies d'endocytose médiées par un récepteur et d'endocytose en phase fluide (141). La portion de l'endocytose en phase fluide sera déterminée par la mesure de la capture du marqueur extracellulaire, l'inuline (141). Deux méthodes expérimentales seront utilisées: la fluorescence parce qu'elle permet un contrôle visuel de la dynamique de l'endocytose et la microscopie électronique (par réaction de photoconversion) (141).

2.7.1.1.1. Cinétique du transport

Après 30 minutes d'incubation, 84 % de la fluorescence précipitent dans l'acide trichloroacétique (TCA), ce qui indique que le catabolisme intracellulaire de la protéine ne joue pas un rôle majeur dans la phase initiale de capture du FITC-albumine (141). Il y a une cinétique de saturation de la capture de FITC-albumine alors qu'une relation linéaire dose/effet existe pour FITC-inuline (141). Ceci suggère que l'inuline est capturée par les cellules par une endocytose en phase fluide et qu'elle emprisonne du fluide extracellulaire alors que le FITC-albumine est endocyté par un mécanisme saturable qui montre des

caractéristiques du processus de liaison à un récepteur (141). Etant donné que la capture de substances par endocytose en phase fluide se produit avec tous les solutés du bain d'incubation, on peut considérer que la capture de FITC-inuline est représentative de la capture de FITC-albumine non médiée par un récepteur (141). Pour chaque concentration donnée, la différence entre la capture de FITC-inuline et de FITC-albumine est une mesure de la capture spécifique de FITC-albumine (141).

La portion spécifique de la capture d'albumine montre ici, un K_m de 24 mg/L, ce qui est proche de la concentration physiologique trouvée dans la lumière tubulaire (30 mg/L) (141). Les cellules OK ne possèdent pas un système de capture à faible affinité pour l'albumine à cause de la contrainte sélective du modèle pour la réabsorption des protéines tubulaires (141). Dans ce modèle, l'endocytose rénale tubulaire des protéines est très liée à leur charge électrique (141). La concentration effective d'albumine au site de capture est inférieure à la concentration luminale et le K_m apparent augmente (141). Les cellules OK ne possédant pas une bordure en brosse dense et donc moins de microvillosités, pourraient apparemment provoquer une plus grande affinité pour l'albumine à cause d'une moins forte répulsion entre les charges de la protéine et de la membrane plasmique (141).

2.7.1.1.2. Effet de la température

On incube des cellules de reins d'opossum (OK) avec du FITC-albumine pendant 15, 30, 60 minutes à la température de la pièce et à 37°C (141). L'albumine-FITC est initialement liée à la membrane plasmique puis capturée par endocytose (141). La fluorescence augmente linéairement pendant les 30 premières minutes puis ralentit, atteignant le maximum après deux heures d'incubation (141). Ce processus est ralenti de façon marquée en diminuant la température à 4°C (141). Initialement, il y a une phase de liaison rapide qui justifie une petite portion de la fluorescence intracellulaire totale à 37° (141).

2.7.1.1.3. Effet de l'hyperosmolarité

FIGURE 2-12 Capture initiale du FITC-albumine dépendante de l'osmolarité extracellulaire (141).

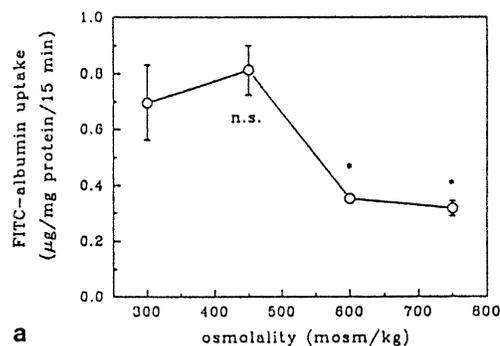


Fig. 6. a Dependence of the initial FITC-albumin uptake (15 min, 30 mg/l, 37°C, bicarbonate medium) on the extracellular osmolality. Osmolality was increased by adding mannitol to the FITC-albumin-containing incubation medium ($n = 4$).

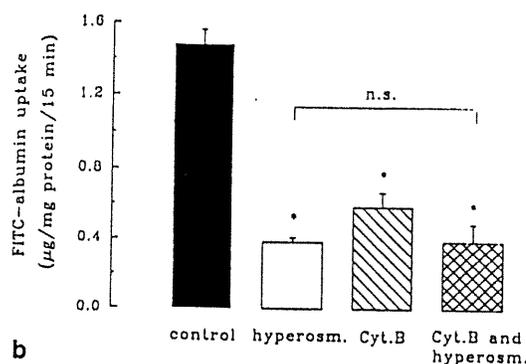
L'endocytose en phase fluide est réduite lors de l'hyperosmolarité dans les cellules OK (141). Ceci est démontré pour l'endocytose de l'albumine (141).

La capture de FITC-albumine est bloquée à 50 % à 600 mOsm/kg (Figure 2-12) (141). Même à de très grandes valeurs d'osmolarité (750 mOsm/kg), il demeure toujours une endocytose de FITC-albumine significative qui peut même excéder la quantité trouvée en phase fluide lors de conditions normales (Figure 2-12) (141).

La viabilité des cellules OK ne souffre apparemment pas de ces conditions d'extrême osmolarité (141). Les cellules qui sont exposées à une osmolarité de 750 mOsm/kg pendant 15 minutes exercent la même capture de FITC-albumine que les cellules témoins après trois heures de récupération dans un milieu de culture ordinaire (141).

Association de la cytochalasine B à l'hyperosmolarité

FIGURE 2-13 Action de l'hyperosmolalité combinée à la cytochalasine B (141).



b Lack of additivity of hyperosmolality and disruption of the cytoskeleton on initial FITC-albumin uptake (15 min, 30 mg/l, 37 °C, bicarbonate medium). OK Cells were subdued to thigh osmolality (750 mOsm/kg) after preincubation with cytochalasin B (100 µmol/l, 1 h, *cross-hatched column*). The remaining FITC-albumin uptake is not significantly different from that at high osmolality alone (*open column*). The *hatched column* represents the initial FITC-albumin uptake at normal osmolality after cytochalasin treatment ($n = 4$)

L'application d'une forte concentration de cytochalasine B et une drastique augmentation de l'osmolalité du milieu diminue la capture de FITC-albumine mais n'abolit pas toute l'endocytose des protéines (Figure 2-13) (141). Il n'y a pas de diminution supplémentaire de l'endocytose résiduelle à 750 mOsm/kg par préincubation avec la cytochalasine B, ce qui suggère que le cytosquelette était déjà altéré par la contraction cellulaire osmotique (141). La fluorescence restante qui n'a pas été bloquée pourrait provenir de la formation de vésicules sous-membranaires et/ou de la liaison de la protéine à la membrane plasmique (141).

2.7.1.1.4. Effet du pH

La capture maximale d'albumine s'effectue à un pH de 6.4-7.4, les conditions les plus acides ou les plus alcalines diminuent gravement la capture de protéines (141).

L'acidification intracellulaire (cytoplasmique) à un pH de 6-6.5 diminue significativement l'endocytose médiée par un récepteur de la transferrine et de l'EGF dans les fibroblastes (141). Le pH lysosomal est important pour la dégradation des protéines parce que la neutralisation des lysosomes réduit l'activité protéolytique (141). L'acidification extracellulaire réduit la captation: avec le modèle de cellules OK, la capture de FITC-albumine atteint son maximum à un pH extracellulaire de 7.4 et approche de zéro à pH=5.4 (141). Il est impossible d'acidifier la surface apicale sélectivement en laissant l'espace baso-latéral inchangé, ce qui explique la contradiction qui existe entre la situation in vivo où le pH sanguin est inchangé et les cultures cellulaires (141).

Par contre et paradoxalement, Christensen et Bjerke, par microperfusion de TP de rat in vivo, montrent que la réabsorption de l'albumine est stimulée par un pH luminal hautement acide (4.5-6) (141).

2.7.1.1.5. Effet du sérum foetal

L'endocytose initiale de FITC-albumine dans les cellules OK polarisées est réduite lorsque le transport est mesuré quelques minutes après l'addition de concentrations élevées de sérum foetal de veau au milieu de culture privé de source extérieure de protéines (141). Il pourrait y avoir trois explications possible (141).

1- Une déplétion en protéines conduirait à une augmentation du recyclage de vésicules vers la membrane plasmique et de ce fait, un plus grand nombre de sites des récepteurs serait exposé à l'albumine extracellulaire (141). Une telle régulation des protéines membranaires par endo- et exo-cytoses se retrouve dans les canaux collecteurs rénaux (141). Ceci impliquerait qu'en présence de sérum pendant un court délai, il y ait une internalisation rapide des récepteurs. Une incubation de 15 minutes du FITC-albumine avec le sérum pourrait causer une capture initiale considérablement amoindrie par rapport à l'incubation sans sérum (141).

2- La carence en protéines augmenterait la synthèse de novo des protéines impliquées dans le processus initial d'endocytose (141).

3- Les agents sériques seraient capables de ralentir l'endocytose ou le ré-affichage en agissant sur le cytosquelette (141). Dans les cellules OK, un mécanisme complexe de rétro-endocytose pour l'insuline a été découvert récemment, ce qui favoriserait cette hypothèse (141).

2.7.2 Préparations de rein de rat isolé perfusé

La partie S₁ ou d'autres segments du TP mesurant 0.6-2 mm de longueur sont disséqués et perfusés à 37°C à des vitesses de 10-15 nL/min (104). Pour déterminer la capture de protéines, après 30 à 40 minutes de perfusion, le perfusé est changé par une solution de perfusion contenant de l'inuline, la protéine marquée et la concentration désirée de la protéine non marquée (104). L'inuline ne se lie pas et ne pénètre pas dans les membranes cellulaires (104). L'inuline accède à l'intérieur de la cellule exclusivement par endocytose en phase fluide et peut être utilisée pour déterminer quantitativement ce processus dans des segments de néphron isolés perfusés (104). A une vitesse de perfusion de 11.5 nL/min, 9.7 ± 1.7 cpm/mm tubules sont détectés après 60 minutes de perfusion avec un perfusé contenant $17 \mu\text{Ci/mL}$ de ¹⁴C-inuline (104).

2.7.2.1. Effet de l'albumine

La vitesse d'endocytose du fluide n'est pas altérée par la présence d'albumine dans le perfusé tubulaire (104). L'endocytose en phase fluide joue donc un rôle négligeable dans la réabsorption de fluide et la capture d'albumine dans le TCP du lapin (104). Cependant, c'est un paramètre difficile à mesurer avec précision (104). Néanmoins, elle fournit deux informations importantes: le rapport entre la capture tubulaire d'une protéine particulière par endocytose en phase fluide et par endocytose d'absorption et

l'effet éventuel de la protéine sur sa vitesse d'endocytose en phase fluide qui est la mesure de la vitesse de formation des vésicules d'endocytose (104). La précipitation à l'acide trichloroacétique (TCA) peut montrer que les marquages dans le fluide tubulaire collecté et le bain demeurent associés à la protéine ou sont sous la forme de produits du métabolisme (104). Pratiquement toute la radioactivité présente dans le fluide tubulaire collecté est précipitable dans le TCA (albumine radiomarquée intacte) alors que le contraire est applicable dans le bain (104). Ceci indique qu'il y a une hydrolyse luminale négligeable de l'albumine et que l'albumine absorbée par les cellules tubulaires est métabolisée et les a.a. qui en résultent sont libérés dans le bain (104).

L'accumulation de protéines endogènes se produit dans des conditions pathologiques où il y a un excès de protéines filtrées (albumine dans le syndrome néphrotique) ou bien dans des conditions dans lesquelles l'acidification du milieu intralysosomal est déficiente (anoxie, administration de bases faibles lysosomotropiques $\text{-NH}_4\text{Cl-}$) (104).

2.7.2.2. Effet de la température

Dans les TP isolés perfusés, une diminution de la température de 37° à 10° et même à 21°C abolit la réabsorption (J) du fluide et celle du Na^+ est pratiquement abolie (137). La diminution de la température à $10\text{-}15^\circ\text{C}$ diminue la DP (différence de potentiel) transépithéliale à des valeurs obtenues en absence de transport actif de Na^+ (137). Etant donné qu'une grande partie du transport de H^+ est couplée à la réabsorption de Na^+ , la sécrétion de H^+ pourrait être affectée par une diminution de la température (137). L'entrée et la sortie de H^+ (à partir de la lumière) sont progressivement réduites à cause de la prolongation marquée des $T_{1/2}$ de l'acidification et de l'alcalinisation (137). Les mêmes gradients de H^+ sont atteints mais plus lentement qu'à 37°C (137). Les flux sont réduits de 26 % de la valeur obtenue à 37°C lors de l'acidification et de 13 % lors de l'alcalinisation (137). La sortie de H^+ et son coefficient de vitesse diminuent progressivement avec une

diminution de la température (137). L'entrée de H^+ montre des valeurs maximales à $37^\circ C$ (137). Au-dessus et en-dessous de $37^\circ C$, les flux et les coefficients de vitesse d'acidification tendent à diminuer (137). Donc, le flux entrant de H^+ est plus sensible lors du fonctionnement cellulaire optimal que le flux sortant de H^+ et dépend d'un processus (i.e. le métabolisme cellulaire) qui est perturbé par des températures élevées (137). Un modèle a été proposé pour le TP de mammifères et démontre qu'une entrée de H^+ s'oppose à sa sortie du tubule, le pH luminal à l'état stable étant déterminé par l'équilibre entre les deux processus (137). Il n'y a pas uniquement de la diffusion passive (137). Il y a également un échangeur Na^+/H^+ grâce auquel le flux d'entrée de H^+ est couplé à la sortie de Na^+ (137). La température agit de la même façon sur les deux types de flux car ils s'effectuent via l'échangeur Na^+/H^+ (137). Au-dessus de $37^\circ C$, le flux sortant continue d'augmenter tandis que le flux entrant diminue beaucoup. Le métabolisme cellulaire semble être perturbé et pourrait effacer le gradient de Na^+ à travers les membranes lumineuses en diminuant la sortie de H^+ sans réduire l'activité de l'échangeur, ce qui probablement se produit à de plus basses températures (137). Il pourrait y avoir une augmentation de la sortie de H^+ puisque le gradient Na^+ pourrait favoriser la sortie de H^+ (137). Il en découle un gradient transépithélial en H^+ stable à de basses températures à cause d'une diminution identique des flux entrant et sortant alors qu'à des températures plus élevées, leurs gradients diminuent (137).

2.8. Inhibiteurs de l'absorption de l'albumine

2.8.1. a.a. basiques

Une injection intra-veineuse d'a.a. basiques (lysine) conduit temporairement à une augmentation considérable de l'excrétion urinaire d'albumine et de protéines de faible P.M. (β_2 -microglobuline, chaînes λ d'immunoglobulines) (67). La perfusion de reins isolés de rat avec 5 mM de lysine conduit à une rupture des microvillosités et à une

inhibition de l'absorption tubulaire de β_2 -microglobuline et démontre différents effets sur le transport (67). Les protéines plasmatiques de faible P.M. et des petites quantités d'albumine sont filtrées au niveau du glomérule et sont normalement réabsorbées et catabolisées en grande quantité par les cellules du TP (67). Etant donné que l'injection d'a.a. basiques n'altère pas le GFR, on peut penser que les a.a. basiques inhibent la capture de protéines dans le TP (67). Ici, la lysine aurait un effet similaire à la bafilomycine (BAF), i.e. elle inhiberait l'acidification endosomiale en contribuant à la production d'un potentiel membranaire inhibant secondairement la H^+ -ATPase. Selon d'autres auteurs, cette inhibition n'est pas causée par des effets directs toxiques sur les cellules mais, soit par une diminution de la liaison de la protéine à la membrane luminale cellulaire (i.e. la première étape dans la capture par endocytose de la protéine) et de ce fait, par une diminution de la capture d'albumine (67,106) soit en interférant avec le trafic endosomal.

L'effet de la lysine sur l'accumulation d'albumine rénale dépend de la concentration de lysine utilisée (67). Cette accumulation, tout comme celle de lysozyme dans les expériences sur des animaux entiers, est provoquée par une inhibition de la réabsorption d'albumine dans le TP et dépend de l'efficacité du TP à réabsorber la protéine et du GFR (67). Une autoradiographie montre une diminution du nombre de grains d'argent dans les vacuoles d'endocytose et les lysosomes dans des tubules perfusés avec de la lysine, ce qui laisse penser que la lysine empêcherait la capture normale par endocytose de la protéine dans le TP mais la fréquence et l'ultrastructure des vacuoles d'endocytose ne changent pas (67).

La liaison de l'albumine cationique est inhibée compétitivement par la L-lysine et le cytochrome c cationiques (67). La liaison du produit à la bordure en brosse paraît être sélective pour le cation (67). In vivo, une infusion de lysine conduit à une hyperkaliémie, une kaliurèse, une bicarbonaturie, une acidose métabolique extracellulaire et probablement à une alcalose intracellulaire (67). Pour maintenir la neutralité

intracellulaire, l'entrée de lysine dans la cellule est suivie par une sortie de Na^+ et de K^+ de la cellule vers le milieu extracellulaire (67).

2.8.2. Cytochalasine B

La capture de l'albumine par les cellules du TP s'effectue par un processus d'endocytose d'adsorption dépendant directement de l'architecture cellulaire: ce processus est inhibé par la cytochalasine B (126,163). Les cellules montrent des changements morphologiques marqués: perte partielle de leur contact intercellulaire et augmentation de la forme sphérique (141). La cytochalasine B rompt artificiellement les filaments du cytosquelette et influence l'endocytose de l'albumine (141). Elle inhibe de façon marquée l'absorption tubulaire de plusieurs protéines de faible P.M. à des concentrations qui n'affectent pas la réabsorption du fluide (126). Ceci pourrait être provoqué par un problème stérique (pas suffisamment d'espace pour le mouvement libre des organelles), ce qui bloque fonctionnellement l'action du cytosquelette (141). La cytochalasine est capable de réduire la capture de FITC-albumine et de FITC-inuline au point d'atteindre 50 % des valeurs normales pour de nombreuses concentrations de substrat (141). Un cytosquelette intact est donc un prérequis nécessaire pour la capture de protéines et l'endocytose en phase fluide dans les cellules OK (141).

2.8.3. Iodoacétate

L'iodoacétate (4 mM), un inhibiteur de la glycolyse, inhibe totalement l'absorption de l'albumine chez le lapin ainsi que la réabsorption du fluide tubulaire. A de plus grandes concentrations, on observe une forte inhibition de la réabsorption du fluide (126). En général, l'iodoacétate inhibe l'absorption d'albumine plus fortement que celle du fluide, ce qui suggère une dissociation des deux types d'absorption (126). L'iodoacétate n'interfère avec le transport que chez les espèces qui dépendent de la glycolyse pour leur

formation proximale d'ATP, comme chez le lapin. Chez le chien dont le TP n'est pas glycolytique, on observe peu ou pas d'effet avec cet inhibiteur (voir résultats). L'ATP est requis dans plusieurs étapes pour le processus d'endocytose: déclathration des vésicules tapissées, acidification des endosomes, mouvements intracellulaires des endosomes, etc..

2.8.4. Chloroquine

La chloroquine (0.1 mM) inhibe presque complètement la capture d'albumine. La réabsorption du fluide demeure normale (126). La chloroquine est une base qui empêche l'acidification endosomale. L'utilisation de cet inhibiteur démontre qu'il n'y a pas de couplage entre le transport de l'albumine et le fluide dans le TP (126).

2.8.5. NH₄Cl

2.8.5.1. Rôles in vitro

In vitro, le NH₄Cl fournissant du NH₃ provoque une déplétion des récepteurs à la surface cellulaire et une accumulation des complexes dans un compartiment intracellulaire pré-lysosomal (57). Il interfère également avec l'acidification lysosomiale et devrait donc mimer l'effet de la chloroquine. Nous verrons que nos expériences confirment ce fait.

2.8.5.2. Rôles in vivo

L'administration de NH₄Cl *in vivo* va médier plusieurs autres changements reliés à la production d'une acidose métabolique.

2.8.5.2.1. Hypertrophie cellulaire

Le NH_4^+ peut en effet moduler la croissance rénale et l'augmentation de l'ammoniogénèse rénale peut conduire à l'hypertrophie rénale retrouvée dans le diabète sucré, lors d'une diminution de la masse rénale et lors d'une charge en protéines (47). La suppression de la dégradation protéique par le NH_4Cl conduit à une accumulation de protéines dans la cellule, ce qui entraîne l'hypertrophie cellulaire (47).

2.8.5.2.2. Diminution de l'activité protéolytique

Les agents acidotropes tels que le NH_4Cl et la chloroquine s'accumulent dans les lysosomes et dans les autres compartiments intracellulaires acides, ce qui provoque une augmentation du pH dans les compartiments (par diffusion dans l'espace lysosomal et par le tamponnement des H^+) et une diminution de l'activité protéolytique plutôt qu'une inhibition de la sortie des catabolites qui résulte de cette protéolyse (30,47). L'effet inhibiteur de ces bases peut être réversible rapidement et totalement, ce qui indique que l'inhibition de l'hydrolyse lysosomiale n'est pas provoquée par un effet cytotoxique de longue durée de la chloroquine et du NH_4Cl (30). Le contenu cellulaire en protéases lysosomiales (cathepsines B et L) est réduit dans les cellules rénales en culture exposées au NH_4Cl (47).

Après avoir exposé pendant deux jours les cellules OK au repos à 20 mM de NH_4Cl , elles contiennent 18 % de plus de protéines que les cellules non exposées au NH_4Cl (47). Golchini et al confirment que des cellules JTC ou des cultures primaires de cellules de TP de lapin à des concentrations en NH_4Cl variant entre 2 et 20 mM provoquent une augmentation du contenu en protéines dépendant de la dose mais à 20 mM, la densité cellulaire dans les deux catégories de cellules varie (47).

A une concentration en NH_4Cl de 20 mM, on a rapporté une augmentation significative de la synthèse protéique, ce qui suggère que l'effet du NH_4Cl sur la synthèse

protéique est plutôt indirect par altération de la densité cellulaire (47). Des résultats identiques ont été retrouvés dans les cellules OK subconfluentes où le NH_4Cl augmente la synthèse protéique par rapport aux cellules sans NH_4Cl lorsque la quantité de cellules traitées au NH_4Cl est inférieure à celle des cellules sans NH_4Cl . Le NH_4Cl n'augmente pas la synthèse protéique lorsque la quantité de cellules est identique dans les deux groupes avec et sans NH_4Cl (47). Donc, le NH_4Cl inhibe directement la dégradation des protéines alors que les effets sur la synthèse protéique varient en fonction de la densité cellulaire (47).

Pour mesurer la synthèse protéique, Golchini et al ont utilisé l'incorporation de ^3H -leucine dans les protéines cellulaires sans excès de leucine non marquée dans le milieu (47). En plus d'éliminer le catabolisme de la protéine et possiblement d'altérer la source intracellulaire de leucine, le NH_4Cl inhibe également l'activité de la déshydrogénase des a.a. ramifiés dans les cellules LLC-PK1 en culture (47). Cependant, des observations contradictoires ont été rapportées par Mitch. En effet, il a observé que le NH_4Cl augmente le contenu protéique de ces cellules en inhibant leur dégradation mais sans promouvoir la synthèse (47). Il note que le nombre de cellules et leur densité dans les monocouches traitées avec et sans NH_4Cl sont similaires (47). L'augmentation du contenu en protéines est entièrement due à la suppression de la dégradation protéique, le taux de synthèse de ces protéines ne différant pas entre les deux types de cellules (47). L'augmentation du contenu en protéines des cellules accompagnant l'hypertrophie rénale peut résulter d'une augmentation de la synthèse de protéines ou de la diminution de la dégradation des protéines (47). Il paraît évident que l'altération de la dégradation des protéines module la croissance rénale (47). Le rétablissement du contenu en protéines après une diète sans protéines est largement dû à la suppression du catabolisme rénal des protéines (47).

2.8.5.2.3. NH_4^+ et l'échangeur Na^+/H^+

La capture de Na^+ par les vésicules des microvillosités rénales de lapin est inhibée par le NH_4^+ (91). Elle est stimulée par des gradients de H^+ sortants et est inhibée par des gradients H^+ entrants (91). Les gradients de Na^+ entrants entraînent la sortie de H^+ (91). La sortie contre un gradient de H^+ provient des gradients entrants de NH_4^+ imposés (91). La trans-stimulation du flux de Na^+ grâce au Na^+ ou au NH_4^+ suggère soit que l'échangeur à pH 7.5 n'est pas saturé en H^+ de sorte que des transporteurs supplémentaires pour le flux de Na^+ sont recrutés en présence de trans Na^+ ou de NH_4^+ soit que la liaison, translocation ou la rupture de liaison du Na^+ et du NH_4^+ avec ces transporteurs est plus rapide que celle du H^+ (91). Le NH_4^+ interagit directement avec l'échangeur Na^+/H^+ mais les gradients directement entrants de NH_4^+ pourraient alcaliniser l'espace intravésiculaire par une entrée de NH_4^+ via une diffusion non-ionique de NH_3 plutôt que par un échangeur NH_4^+/H^+ (91). Etant donné que le NH_3 est en équilibre de diffusion à travers le cortex rénal, l'acidification du fluide du TP via l'échangeur Na^+/H^+ peut conduire à la sécrétion de NH_4^+ (91). Si la concentration intracellulaire en H^+ n'est pas saturée et que ce H^+ peut être utilisé par l'échangeur Na^+/H^+ et/ou si l'échangeur peut médier le transport de $\text{Na}^+-\text{NH}_4^+$ plus rapidement que celui de Na^+/H^+ , il pourrait en résulter une augmentation de NH_3 cortical rénal qui impliquerait une augmentation du NH_4^+ intracellulaire qui stimulerait la vitesse d'absorption du bicarbonate (91). De plus, l'inhibition de la capture de Na^+ par NH_4^+ externe pourrait augmenter indirectement l'alcalinisation induite par le NH_4^+ de l'espace intra-vésiculaire (91).

3. CATABOLISME DE L'ALBUMINE

3.1. Généralités

L'albumine est dégradée librement par un processus de premier ordre qui ne dépend pas de l'âge (87). La constante de vitesse du catabolisme est proportionnelle à la concentration de l'albumine sérique (87). La fraction du pool intravasculaire d'albumine catabolisée par unité de temps est le taux fractionnel du catabolisme de l'albumine (87).

Il est évalué à $\pm 8-10\%$ du pool intravasculaire/jour (43,72,87). A peu près 10 % du catabolisme de l'albumine s'effectue dans le rein (87,121).

On propose également l'existence de récepteurs pour l'albumine à la surface cellulaire des hépatocytes et des adipocytes (129). La liaison de l'albumine radio-marquée aux hépatocytes et aux adipocytes démontrerait qu'il y a un million de récepteurs/hépatocyte et 10 millions/adipocyte (129). Entre 4° et 37°C, la liaison de l'albumine aux cellules ne dépend pas de la température et serait non-endocytotique c'est-à-dire que l'albumine n'entrerait pas dans les cellules et interagirait seulement avec la surface cellulaire (129).

3.2. Méthodes de mesure du catabolisme

Ces méthodes utilisent la technique d'injection de protéines radio-marquées au ^{131}I et ^{125}I (84). On effectue une injection intra-veineuse d'une quantité connue de l'albumine radio-marquée (84). On prélève du sang après 10 min pour déterminer le volume plasmatique et la masse protéique intravasculaire (84). L'urine et les fèces (pathologies gastro-intestinales) sont recueillies pendant 24 h (84).

3.2.1. Clairance métabolique

La clairance métabolique se calcule à partir de l'excrétion quotidienne de ^{131}I et ^{125}I urinaire et la concentration plasmatique moyenne journalière de l'albumine radio-marquée (84).

3.2.2. Courbe de disparition plasmatique

Etant donné que l'albumine radio-marquée est injectée dans le compartiment plasmatique et que la dégradation se produit dans ou à proximité des parois des vaisseaux sanguins, la dégradation ou la vitesse de catabolisme fractionnel (FCR) pourrait égaliser l'inverse de l'intégrale de l'aire sous la courbe temps (zéro à l'infini) vs concentration (84). Cette courbe montre une chute initiale due au catabolisme et au transfert de l'albumine radio-marquée dans les pools extravasculaires suivie d'une diminution linéaire finale due uniquement au catabolisme et à la perte anormale, observée dans les pathologies gastro-intestinales ou le syndrome néphrotique (84).

3.3. Valeurs normales de catabolisme

La dégradation peut valoir jusqu'à 16.7 % de la valeur totale chez les enfants âgés de moins de trois mois et diminuer avec l'âge pour atteindre 8.4 % chez les enfants âgés de plus de cinq ans. Elle se stabilise à 8.5 % de la valeur totale chez les adultes (84). Il y a 10 g d'albumine qui sont catabolisés au niveau des endothélias vasculaires et 2 g au niveau du TP après la réabsorption de l'albumine filtrée (43).

3.4. Valeurs pathologiques de catabolisme

Une basse synthèse d'albumine peut s'associer à une diminution ou à une augmentation du catabolisme (84). La vitesse du catabolisme se détermine par la clairance métabolique et par la courbe de disparition plasmatique de l'albumine radio-marquée (84). Les patients opérés ou très malades démontrent une augmentation du catabolisme de leur albumine (103). La réponse adrénocorticotrope au stress stimule plus le catabolisme que la synthèse. Lors d'un syndrome néphrotique, 50 % du pool intravasculaire de l'albumine peuvent être catabolisés par jour (43). De grandes quantités d'albumine sont synthétisées aussi bien que catabolisées par les tubules rénaux (123). Selon d'autres auteurs, la plus grande portion de l'albumine filtrée serait réabsorbée et catabolisée par les cellules tubulaires et seule une petite fraction de l'albumine filtrée apparaîtrait dans les urines (43). Mais des microponctions tubulaires effectuées chez des rats néphrotiques montrent que les différents mécanismes de réabsorption tubulaire sont facilement saturés et que l'albuminurie ne semble pas sous-estimer la perte totale d'albumine (43). Le catabolisme absolu de l'albumine n'excéderait pas 12 à 15 g/jour (43).

3.4.1. Diminution du catabolisme

Une diminution du catabolisme est présente dans des pathologies telles que l'analbuminémie, la cirrhose du foie et la malnutrition (84).

3.4.2. Augmentation du catabolisme

Une augmentation du catabolisme est présente dans l'hypercatabolisme endogène et lors de pertes protéiques anormales (84).

Un hypercatabolisme endogène est détecté dans la thyrotoxicose et la maladie de Cushing (84). Une perte protéique anormale avec une hypoalbuminémie

hypercatabolique est dépistée dans les maladies dermatologiques (brûlures), dans le syndrome néphrotique et dans certaines maladies gastro-intestinales telles que la maladie de Ménétrier, les lymphangiectasies intestinales, les néoplasies, les maladies intestinales inflammatoires chroniques (colite ulcéreuse, maladie de Crohn) (84).

Le syndrome néphrotique se caractérise par une hypoalbuminémie sévère due à une albuminurie et à l'hypercatabolisme endogène de l'albumine dans les cellules tubulaires rénales se produisant lorsque l'albumine filtrée à travers la membrane glomérulaire endommagée, est réabsorbée par les cellules tubulaires (84). Cependant, il y a trois mécanismes d'adaptation pour stabiliser le pool d'albumine plasmatique (87).

Le pool d'albumine plasmatique peut être déplacé vers l'espace intravasculaire, la vitesse de synthèse de l'albumine peut augmenter ou la vitesse de son catabolisme peut diminuer (87). Seuls les deux derniers mécanismes cités peuvent rétablir l'état d'équilibre entre la production et la somme de la perte exogène et du catabolisme de l'albumine (87). Le pool d'albumine extravasculaire est plus fortement déprimé que le pool intravasculaire et sa mobilisation répond à une diminution de la pression oncotique plasmatique ou à une augmentation de la pression hydrostatique transcapillaire (87).

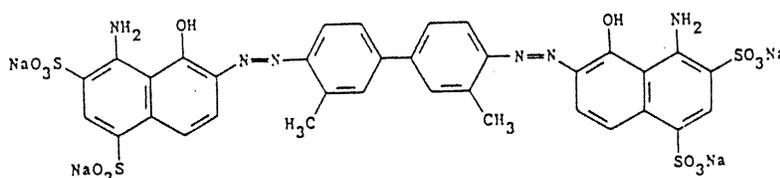
La concentration interstitielle de protéines est réduite par deux mécanismes (87). Etant donné que l'eau traverse les capillaires plus rapidement que les protéines, une augmentation de la pression hydrostatique ou une diminution de la pression oncotique provoquera un transfert d'une plus grande quantité de l'ultrafiltrat plasmatique relativement pauvre en protéines dans l'espace interstitiel, ce qui dilue l'albumine interstitielle (87). L'augmentation du flux d'eau transcapillaire entraîne une augmentation du flux lymphatique qui transfère l'albumine de l'espace interstitiel vers le compartiment plasmatique (87). Par ce second mécanisme, la concentration interstitielle d'albumine diminue suite à une diminution de sa concentration sérique (87). Ce mécanisme est responsable de la redistribution de l'albumine qui se produit dans le syndrome néphrotique (87).

4. MESURE DU TRANSPORT RENAL D'ALBUMINE SUR DES TUBULES PROXIMAUX ISOLÉS

4.1. Bleu d'Evans

Antérieurement dénommé T-1824 (tolidine (69)), le Bleu Evans (BE) est synthétisé à partir d'une mole de diazo o-toluidine et de deux moles de amino-1 naphtho-8-2, 4-disulfonate (Figure 2-14) (2).

FIGURE 2-14 Structure du Bleu Evans (1).



C'est un isomère du bleu trypan (27), de formule $C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$ (1). Il possède un P.M. de 960.83 (59,78) et est un colorant azo bleu électro-négatif (27). Sa longueur d'onde d'absorption maximale dans le sérum s'établit à 605 μm (66). Son pK varie entre 1 et 2.5 (2).

4.2. Liaison du BE à l'albumine

La fixation du BE à l'albumine est étudiée par électrophorèse, ultracentrifugation, en suivant les effets des protéines plasmatiques sur le spectre d'absorption du BE et au moyen d'un test de liaison de BE libre au cellophane (98,131). Le BE à basse concentration migre dans le sérum exclusivement avec l'albumine mais à

des concentrations élevées, le BE migre avec α -globuline (98). Le T-1824 forme un complexe dissociable avec l'albumine et les globulines (98). En 1942, Rawson a utilisé une concentration de 0.098 % de T-1824 pour l'électrophorèse d'un échantillon de sérum (131). Après quatre heures d'électrophorèse, trois fractions, en l'occurrence, l'albumine, les globulines (α et β), les γ -globulines ont pu être séparées et leurs concentrations calculées en protéines et en BE (131). La fraction albumine montre un rapport de 8.3 moles de BE pour 1 mole d'albumine, la fraction α et β -globulines, 5 moles de BE pour 1 mole d'albumine et la fraction γ -globulines ne présente aucune trace de BE (131). Le BE migre dans le plasma seulement avec la fraction albumine à moins que le rapport BE:albumine soit supérieur à 8 :1 (131).

On peut estimer approximativement le nombre de molécules de BE se liant à une molécule d'albumine à pH et concentration de NaCl physiologiques (131). Rawson et al montrent que le T-1824 migre avec l'albumine lors d'une électrophorèse lorsque le rapport molaire BE:albumine équivaut à $\leq 14:1$ mais séparément pour des rapports plus élevés parce que tout le BE peut ne pas être alors fortement lié (35). L'augmentation de la mobilité de l'albumine humaine en présence de concentration élevée de T-1824 (0.019 %) à pH=7.4, par rapport à celle calculée pour l'albumine seule, peut s'expliquer par le fait que le BE lié à l'albumine empêche la dissociation de quelques groupes basiques (131). Une faible partie du T-1824 peut également être réabsorbée par les cellules tubulaires indépendamment de la réabsorption de l'albumine (34). Une partie des molécules de colorant peuvent être détruites par réduction des groupes azo lors du passage par les tubules (34). La distance relativement grande séparant les groupements sulfonates du BE favoriserait les liaisons multiples qui sont importantes pour stabiliser l'albumine (2). Les a.a. basiques (NH_4^+ des lysines) de l'albumine se combineraient avec les groupements sulfonates en position 2 et 4 du BE (2). La mobilité électrophorétique de l'albumine humaine augmente par la liaison réversible d'un certain nombre de ses groupements basiques ($14 < n \leq 8$) avec les groupements du BE (2). En fonction du pH (acide), des

groupements basiques additionnels sont exposés, ce qui fait varier la constante de dissociation (2).

L'addition de plasma à des solutions de BE change le profil de la courbe d'absorption. L'effet maximal est atteint par l'addition d'albumine à des concentrations d'à peu près 0.1 mole d'albumine pour 1 mole de BE (131). Dans ce cas, la densité optique augmente avec l'augmentation de la concentration d'albumine (131). Lorsque la concentration en albumine augmente en présence d'une concentration constante de BE (0.002 %), la densité optique du T-1824 atteint sa valeur minimale quand le ratio molaire BE/albumine=11 (131). La diminution de la densité optique provoquée par l'albumine témoigne de la liaison du BE (131). La diminution continue de la densité optique avec une augmentation de la concentration d'albumine représente la conversion du BE libre en complexe albumine-BE (131). La valeur minimale de la densité optique pourrait représenter le nombre maximal de molécules de BE qui se lie par molécule d'albumine (131).

	Constante de diffusion (10^7)	Vitesse de sédimentation (10^{13})	P.M.(kDa)
Sérumalbumine	6.3	4.56	70.3
+ BE dilué (0.0005 %)	5.9	4.32	71
+ BE concentré (0.038 %)	6	5.13	83

TABLEAU 2-I. Poids moléculaire de l'albumine humaine avant et après addition de Bleu Evans déterminé par ultracentrifugation (131).

Quoique la probabilité de liaison de l'albumine au BE à des températures différentes soit probablement assez différente, l'augmentation apparente du P.M. indique que la mobilité à l'électrophorèse, la taille ou la forme de l'albumine sont affectées par sa

liaison au BE (Tableau 2-1) (2). La liaison du BE à l'albumine s'effectue en terme de secondes (2,59), et même de msecondes. A 37°C, la liaison de l'albumine au BE est à moitié complétée en moins de 15 secondes tandis que la liaison du colorant sous forme libre avec des tranches de tissu est à moitié complétée en 25 minutes (2). Patterson conclut que le BE est fortement lié à l'albumine (35,59).

Etant donné que le BE est un colorant acide, il se fixera maximalement à la protéine quand il sera présent sous sa forme basique (98). Le Veen a démontré que chaque molécule d'albumine porte 70 sites de liaison pour le BE, chaque site ayant une constante d'équilibre de $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (59). A pH=7, moins de moles de BE s'uniront à l'albumine (98).

Freedman a découvert qu'il n'y a aucune interaction électrostatique apparente entre le BE et l'albumine liés à l'équilibre (59). A pH=7.3, les charges électriques nettes de l'albumine et du BE seraient évaluées à -20 et -4 respectivement (59).

4.3. Devenir du BE injecté i.v.

Après son mélange dans le sang, le BE disparaît tellement lentement de la circulation que sa vitesse initiale de disparition s'approche ou égale celles de nombreuses autres protéines plasmatiques (2). Une molécule d'albumine plasmatique possède un certain nombre de sites (8 à 14 selon les auteurs) sur lesquels le colorant se lie fortement, ce qui nous permet de prédire les quantités de BE sous forme libre et liée dans les fluides corporels (2). Etant donné que la majorité (>99.9%) du BE se lie et qu'il demeure longtemps lié à la protéine, sa fuite du courant sanguin témoigne de la clairance de l'albumine (2). En effet, la mesure du "turn-over" de la protéine plasmatique avec le BE se compare bien à celle de l' ^{135}I -albumine (44).

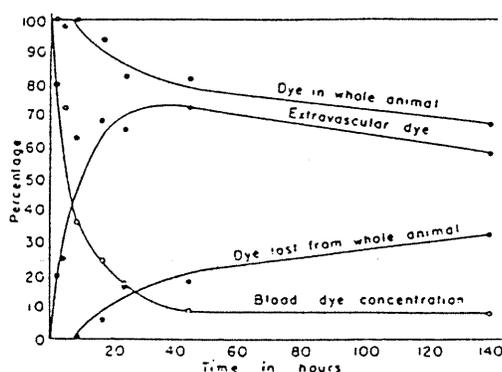
La diffusion du T-1824 injecté correspond essentiellement à celle de l'albumine (2). Quelques minutes s'écoulent avant que la distribution du colorant soit complétée dans les fluides approvisionnant la lymphe (2). L'équilibre avec tout le compartiment extracellulaire demande plus d'une heure comme le montre les courbes de

concentration mesurées en fonction du temps sur la lymphe recueillie (2). Chez les chiens anesthésiés, la distribution du BE atteint un état stable après 90 minutes (2). Sur un total de 176×10^{-7} mole de BE/L de plasma, 7.9×10^{-7} mole (4.4 %) disparaît dans l'heure qui suit l'injection (2).

Au moins 4 % du BE est retrouvé dans la bile et 0.2 % est excrété dans l'urine (2). Le 4.4×10^{-7} mole/heure restant correspond à la quantité de colorant qui disparaît dans la première heure et qui n'est pas récupéré par la lymphe (2). A l'équilibre, le flux total de lymphe livrerait 3.2×10^{-7} mole de BE/heure (2). Le T-1824 reste dans la circulation plus de quatre jours après son injection (2). La clairance plasmatique maximale du BE atteint 0.72 mL/min et la clairance minimale, 0.3 mL/min (2). Les reins assurent une clairance de 2 μ L/min pour le BE (2).

On note une différence au niveau de la vitesse d'échappement entre le T-1824 et la lysine*-albumine plasmatique (2). La moitié du premier produit est perdue en 14 h alors que la moitié du second est perdue en 24 h (2).

FIGURE 2-15 Courbes des variations du Bleu Evans intra- et extracellulaires (41).



La plus grande vitesse attribuée au BE suggère que le complexe albumine-BE s'échappe en pénétrant dans les cellules vivantes et que le BE ne retourne jamais dans la circulation

(2). Une fois à l'intérieur de la cellule, le colorant se combine probablement avec les a.a. dibasiques des nucléoprotéines (2).

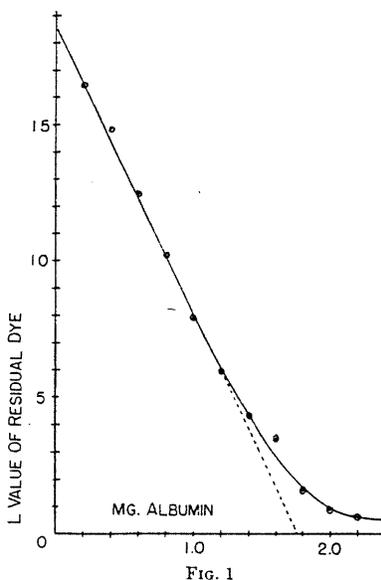
La méthode utilisée pour déterminer la quantité de BE accumulée dans les tissus consiste en une homogénéisation du tissu dans une solution concentrée d'urée, une scission du complexe albumine-BE et une précipitation partielle de la protéine et des chromogènes avec de l'acétone suivies d'une précipitation totale des chromogènes en additionnant des réactifs de Somogyi (41).

Le rapport des concentrations de l'albumine et du BE sériques varie en fonction du temps et ce, jusqu'à 70 heures après l'injection intra-veineuse de 20 mg de BE chez des rats (Figure 2-15) (41). Si la concentration des protéines sériques est considérée comme étant constante, cette courbe peut être interprétée comme une courbe de la concentration sanguine du colorant et cette courbe est presque identique à celle trouvée dans le sang (41). Après une administration de 12.5 mg de BE, à peu près 90 % de la dose de colorant injectée quitte apparemment le sang mais seulement 15 % pourraient ne pas être retrouvés dans le corps dans les 40 heures (41). Après 140 heures, 67 % pourraient toujours se trouver dans le corps (41). Patterson, en 1992, montre qu'il existe une excellente concordance des résultats obtenus avec les marqueurs de l'albumine: le BE et le ^{135}I mais le BE est le marqueur le plus commode pour l'albumine (35).

Chez des patients atteints de syndrome néphrotique, le rapport des clairances T-1824 sur albumine atteint 0.83 ± 0.101 (34). La clairance du T-1824 est proportionnelle quoique non identique à la clairance de l'albumine pour un grand nombre de valeurs de clairance de l'albumine (34). La courbe de disparition de complexes albumine-BE montre une phase précoce logarithmique de disparition qui dure approximativement une heure suivie d'une phase linéaire pendant laquelle le BE disparaît du sang à vitesse constante (98). Le BE se combinant sélectivement avec l'albumine, la phase logarithmique est considérée comme une mesure de la perméabilité capillaire de l'albumine (98). La disparition du BE, après la phase logarithmique, pourrait possiblement signifier qu'une quantité définie d'albumine part avec le BE du plasma (98). La vitesse de disparition du

BE du courant sanguin serait le miroir de la vitesse du "turn-over" de l'albumine dans le corps (98).

FIGURE 2-16 Liaison de différentes quantités d'albumine sérique humaine purifiée à du Bleu Evans (98).



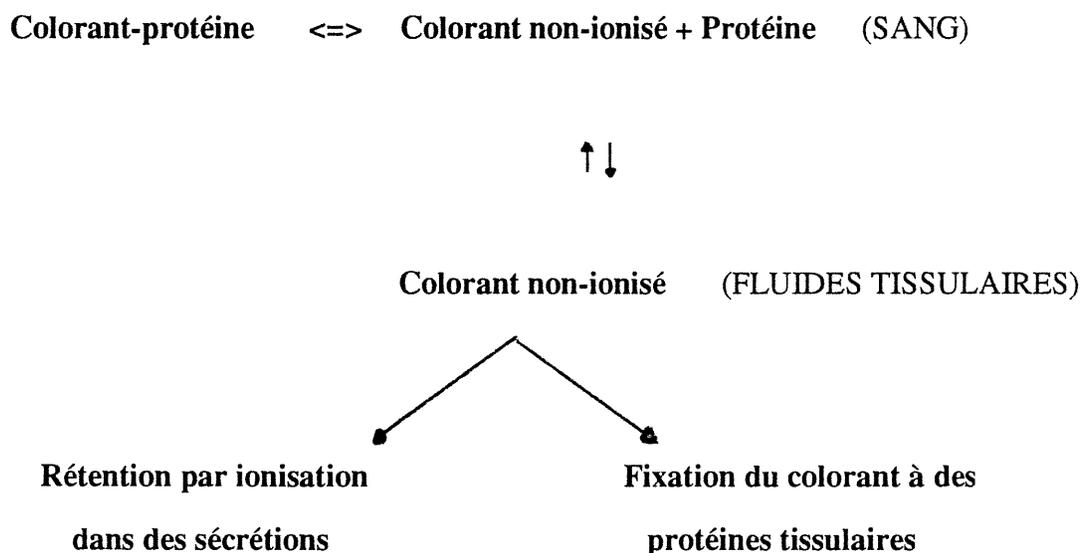
The combination of varying concentrations of purified human serum-albumin with Evans blue dye is demonstrated. The dotted straight line is the expected curve with an irreversible reaction (dye + protein \rightarrow dye-protein). Single determinations are represented by dots, coinciding duplicate and triplicate determinations by circles. All determinations were made in triplicate.

Diverses concentrations d'albumine sont employées (0 à 2.6 mg/3 mL salin) auxquelles sont ajoutés 6 mL de BE 0.03 % tamponné à pH=2.5 (Figure 2-16) (98). Comme la courbe obtenue est linéaire seulement en présence d'un gros excès de BE, qu'elle tend à se stabiliser ou atteint un plateau avec une concentration relativement élevée en protéines, une caractéristique des courbes de dissociation des acides et des bases faibles, on peut en déduire que la réaction de liaison entre l'albumine et le BE est réversible (98).

La portion linéaire de la courbe représente la combinaison stoechiométrique du BE avec l'albumine puisque la réaction réversible a été déplacée vers la droite par un excès de colorant (98). Sous ces conditions, 70 moles de BE peuvent se combiner avec une mole d'albumine (98). Dans les mêmes conditions de purification et de concentration

que pour l'albumine, les globulines, autres protéines plasmatiques, fixent moins de BE que l'albumine, les pentes des parties linéaires de la courbe étant moins raides (98). Une fois le BE dissocié de l'albumine, il diffuse dans la circulation et se fixe dans les tissus favorisant ainsi la dissociation des complexes albumine-BE pour maintenir l'équilibre chimique (Figure 2-17) (98). Cliniquement, peu de molécules de BE sont sous forme libre et leur diffusion dans le fluide interstitiel ne pourrait totalement justifier la phase rapide précoce de disparition du sang (98). La fixation du BE libre par les protéines tissulaires pourrait aller jusqu'à saturation des protéines tissulaires (98).

FIGURE 2-17 Devenir du Bleu Evans (98).



Le T-1824 se fixe donc aux protéines tissulaires pendant la phase précoce de disparition du colorant présent dans le sang (98).

Cliniquement, le BE existe presque exclusivement sous la forme de complexes protéiniques à cause d'un excès de concentration de protéines (Figure 2-16) (98). Comme la liaison albumine-BE est réversible et que le BE peut diffuser sous sa forme libre, le colorant peut migrer et lentement venir se fixer aux endroits où la protéine sérique n'apparaît pas (Figure 2-17) (98). Ainsi, quand l'albumine migre, le BE suit (98). Le

contraire est vrai seulement s'il peut être démontré qu'il n'y a pas de fixation par d'autres protéines tissulaires ni d'ionisation de BE libre (98).

La disparition initiale du BE du courant sanguin n'est apparemment pas le miroir de la perméabilité capillaire de l'albumine (98). La phase de disparition linéaire tardive du BE plasmatique pour une période de 24 h se chiffre à $\pm 50 \%$ de la concentration du BE (98). Ceci pourrait signifier que 50 % de l'albumine circulante soient recyclés en 24 h (98). La disparition rapide du colorant par rapport à la vitesse relativement lente de la protéine plasmatique isotopiquement marquée est expliquée par le fait que le colorant peut être dissocié de l'albumine sans qu'elle soit métabolisée (98). Lorsque le BE est détaché de l'albumine, il peut retourner dans la circulation et se recombinaison avec la protéine ou être métabolisé, par fixation à d'autres protéines ou par excrétion (98).

4.4. Utilisation clinique du BE

Le T-1824 est un indicateur du "turn-over" de l'albumine plasmatique aussi bon que l'¹³⁵I-albumine dans les phases précoce et tardive de la courbe de disparition (44). Le T-1824 est utilisé en clinique pour l'estimation du volume plasmatique parce qu'il est lié principalement à la fraction albumine dans le plasma (34). Il n'apparaît pas dans l'urine à moins qu'il y ait une protéinurie significative (34).

Après le mélange uniforme du BE dans le plasma et jusqu'à sa réentrée dans la circulation via la lymphe, la courbe de la concentration du BE en fonction du temps définit la vitesse à laquelle il sort du compartiment plasmatique (69). La quantité de BE qui retourne dans la circulation sanguine via le canal thoracique représente seulement 2 % de la quantité totale de BE injectée (69).

Wasserman puis Sterling proposent l'existence d'un pool d'albumine échangeable parce que la phase rapide de disparition de l'¹³⁵I-albumine du plasma se

termine à 50 %, ce qui suggère que les quantités d'albumine intra- et extravasculaires seraient dans un même ordre de grandeur chez l'homme normal (44).

Le transport de T-1824 est étudié lorsque la concentration du BE non lié est maximale (**first circulation phase**) et plus tard, quand la vitesse d'extraction du courant sanguin est probablement indépendante du mélange (**late metabolic phase**) (60). A l'équilibre dans le plasma, moins de 0.1 % du BE existe sous forme libre (60). Un petit échange transcapillaire se produit normalement dans la moindre circulation (60).

Le déplacement des radicaux acide sulfonique des positions 2, 4 aux positions 3, 6 altère profondément la vitesse de disparition (69). Cette modification structurale augmente la fraction de BE perdue dans la première heure de 9 % à 40 % (69), indiquant une liaison accrue du BE. L'albumine stabilise les courbes de spectre d'absorption de BE et augmente la solubilité du colorant dans le NaCl (69).

4.5. Transport des protéines liées au rouge brillant

Selon Smith, ses expériences avec le rouge brillant (RB) vital dont le transport ressemble fortement à celui du BE démontrent que le processus d'élimination commence par une diffusion à partir du plasma, un stockage temporaire dans les phagocytes et le système réticulo-endothélial puis une excrétion du colorant par le foie où la liaison colorant-protéine est coupée (69). Il existerait une similarité frappante du contenu en colorant et en protéine de la lymphe dans de nombreuses régions et pourrait démontrer que la liaison albumine-RB est toujours intacte dans les fluides tissulaires et la lymphe (69).

4.6. Suivi temporel du BE dans le rein

Le BE est transporté dans le TP lors de la réabsorption de l'albumine ou des protéines filtrées marquées au BE. Cinq minutes après une injection de BE (3.5 %) en iv,

il n'y a pas de BE visible dans l'épithélium du TP (166). Après 45 minutes, le BE se loge dans les invaginations de la membrane tubulaire à la base des microvillosités de la MBB (166). Il s'agit des sites de localisation des récepteurs pour l'albumine, et cette localisation traduit probablement la présence de complexes BE:albumine/récepteur.

Une heure après l'injection, de petits granules bleu foncé sont éparpillés juste sous la MBB (166). Des petites vacuoles apicales en provenance de ces invaginations se forment puis fusionnent pour former de plus grandes vacuoles qui s'éloignent de la bordure en brosse (166). Ces vacuoles contiennent du BE. Un très petit nombre de gros granules atteignent le milieu ou la base des cellules tubulaires (166). Plusieurs vésicules apicales coalescent pour former une masse plus dense de BE qui semble être toujours liée à l'albumine (166). Le BE est aussi enfermé dans des granules périnucléaires qui sont peut être en relation avec l'appareil de Golgi qui peut fournir les enzymes protéolytiques (166).

Vingt-quatre heures après l'injection, les granules sont plus gros et s'éloignent tous de la bordure en brosse, la plupart vers le milieu de la cellule (166). Des regroupements de granules bleus sont déjà formés dans le S₁ du TP alors que les granules sont plus diffus dans le S₂ (166). Le plasma, l'espace interstitiel et même la médulla blanche riche en protéines ne montrent pas de complexes albumine-BE au microscope (166).

Trois jours après l'injection, dans le S₁, la zone intermédiaire des cellules, qui renferme exclusivement des granules cytoplasmiques dans des vésicules contenant présumément du BE, est entassée au-dessus des mitochondries et des noyaux sous une forme particulière (166). Cette forme spécifique de cette zone détermine le regroupement des vésicules (166). Le regroupement s'établit au-dessus et autour du noyau, proche du Golgi (166). Ces vésicules contiennent de la phosphatase et des hydrolases (166). Les granules sont tellement denses que le regroupement apparaît sous la forme d'une seule tache (166). Dans le S₂, les granules ne sont pas regroupés mais plutôt dispersés à travers tout le cytoplasme (166).

Six jours après l'injection, le S₁ contient encore de grandes quantités de BE (166). Les groupes de granules paraissent plus petits, en enfilade et décolorés (166). Il y a davantage de granules qui se détachent du groupe et se positionnent plus près de la bordure en brosse qu'après trois jours (166). La décoloration apparente des granules peut indiquer que le BE n'est plus lié à l'albumine (166). Le plasma et le filtrat n'ont plus de BE.

4.7. Transport rénal de lysosomes par des tranches de rein

Du ¹²⁵I-lysozyme est injecté par voie intraveineuse à des rats (37). La localisation du lysozyme absorbé est déterminée par autoradiographie en microscopie électronique. L'autoradiographie de tranches corticales montre des grains remplis de ¹²⁵I-lysozyme (37). Le matériel accumulé (protéines absorbées) dans les lysosomes, disparaît des cellules tubulaires après quelques heures ou quelques jours (37). Pour fin d'observation, le tissu est divisé en six régions: les vacuoles d'endocytose, les lysosomes, le L-cytoplasme (le cytoplasme adjacent aux lysosomes i.e. les zones externes des lysosomes dans un rayon de 0.5 μ de la membrane lysosomiale), le restant du cytoplasme, le noyau et l'espace extracellulaire (tous les compartiments hors des cellules du TP) (37). Au début de l'incubation, 90 % de la protéine radio-marquée sont localisés dans les vacuoles d'endocytose, lysosomes ou le L-cytoplasme alors que 6 % sont associés avec d'autres structures cellulaires et 4 % sont localisés à l'extérieur des cellules du TP. Après une ou deux heures d'incubation, aucun grain n'est localisé dans les vacuoles d'endocytose. Initialement, les lysosomes (65.5 %) et le L-cytoplasme (10.7 %) contiennent 76 % de la protéine, 85 % après une heure d'incubation et 89 % après deux heures. Aucune accumulation de grains n'est observée dans des cellules autres que celles du TP. La protéine marquée localisée dans les vacuoles d'endocytose est apparemment transférée dans les lysosomes au début de l'incubation (37). Selon Straus, la fusion des vacuoles d'endocytose et des lysosomes débute 15 à 20 minutes après l'injection (36).

D'autre part, Maunsbach démontre par autoradiographie et par microscopie électronique que dix minutes après la microperfusion de l' ^{125}I -albumine, l'albumine radiomarquée est localisée dans les petits lysosomes apicaux des cellules du TP de rat (109). Sa capture et son transport dans les cellules de TP ne dépendent donc pas de la filtration glomérulaire (36). L'albumine diffuse directement dans la lumière du TP. Si d'autres protéines sont utilisées (ribonucléase, peroxydase, cytochrome C), leur filtration glomérulaire varie parce qu'elle dépend de leur taille, de leur P.M., de leur charge électrique. Il est donc difficile de comparer la filtration glomérulaire de différentes protéines à moins qu'elles soient très similaires au niveau de leur P.M. et de leur pI (36).

Quoique la protéine radio-marquée localisée dans les lysosomes soit digérée durant l'incubation, plusieurs lieux pourraient être considérés comme le site de catabolisme (136). Il est concevable que la protéine soit dégradée dans les lysosomes ou après passage à travers la membrane lysosomiale, dans le cytoplasme ou même dans le milieu d'incubation (136). Les deux dernières possibilités sont fallacieuses puisque la protéine n'est dégradée ni par le milieu d'incubation ni par des protéines solubles du tissu cortical à un pH identique au pH cellulaire (136). Comme les enzymes lysosomiales peuvent dégrader le ^{125}I -lysozyme, on peut en déduire que la protéine est dégradée par les lysosomes (136). Les enzymes lysosomiales rénales possèdent des capacités de digestion qui diffèrent en fonction des protéine-substrats (136). Les protéines de petit P.M. peuvent être digérées dans les lysosomes de cellules de TP intactes (lysozyme, ribonucléase, β_2 -microglobuline, chaînes λ d'immunoglobulines) (136).

On a suggéré qu'une partie de la protéine absorbée dans le tubule soit transférée intacte de la paroi tubulaire vers l'espace périlitubulaire à cause d'expériences effectuées *in vitro* sur des tubules de limandes (136). Des études histochimiques montrent que seulement 4 % de la radioactivité totale sont retrouvés dans le milieu pendant l'incubation (136). Parmi ces 4 %, on peut compter le ^{125}I -lysozyme relâché dans le milieu suite à la rupture des cellules superficielles lors de la préparation des coupes, la protéine localisée originellement dans l'espace périlitubulaire et qui diffuse hors des coupes pendant

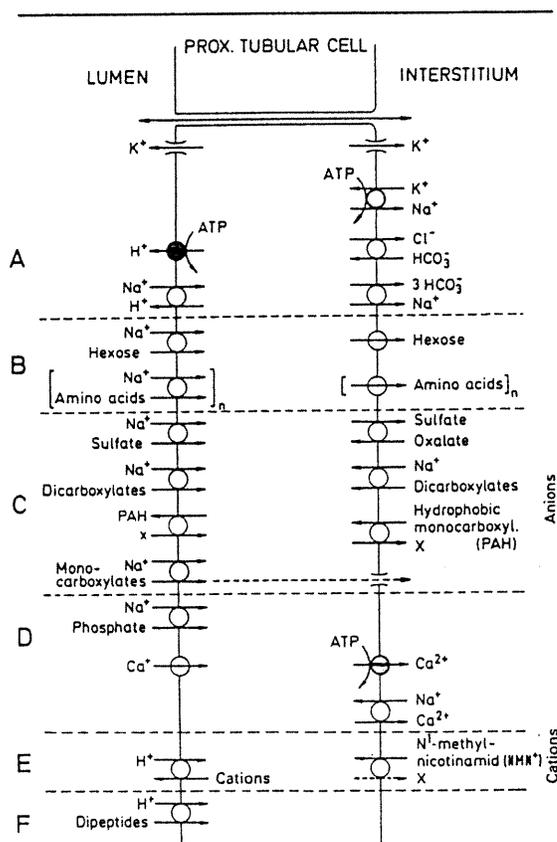
l'incubation (136). On peut conclure que la protéine radio-marquée localisée initialement dans la paroi du TP n'est pas transportée intacte dans l'espace péri-tubulaire (136).

5. PRINCIPAUX TRANSPORTEURS DU TUBULE PROXIMAL

SUSCEPTIBLES D'INFLUENCER LE CATABOLISME DE L'ALBUMINE

Nous avons vu le rôle majeur que l'acidification joue sur la fonction des micro-compartiments intracellulaires tels les endosomes et les lysosomes. Nous examinerons donc maintenant les transporteurs susceptibles de produire ou de moduler cette acidification (Figure 2-18).

FIGURE 2-18 Mécanismes de transport du tubule proximal (65).



L'existence de tous ces transporteurs a été démontrée par des études de flux trans-épithéliaux i.e. des mesures du pH intracellulaire, des activités ioniques intracellulaires, du voltage cellulaire et des études sur les vésicules membranaires dérivant des surfaces luminale ou baso-latérale des cellules du TP (33).

Il existe des ATPases de type P, de type V et de type F dont font partie la Na^+ - K^+ ATPase; les pompes à protons; les ATP synthétases mitochondriale et bactérienne respectivement (Figure 2-18) (151).

L'échangeur Na^+/H^+ est également présent dans les cellules de mammifères, notamment les cellules rénales.

5.1. ATPases de type P: la Na^+ - K^+ ATPase

Les ATPases de type P sont composées, en général, d'un seul polypeptide de 70 à 100 kDa qui contient les sites de phosphorylation et de liaison de l'ATP. Cependant, la Na^+ - K^+ ATPase, la plus connue, fait exception car c'est un hétéropolymère qui possède une sous-unité α d'approximativement 112 kDa (146) et un second polypeptide de 45 à 55 kDa, la sous-unité β (Figure 2-19) (135).

La fonction de cette pompe consiste à maintenir un gradient électrochimique de Na^+ de part et d'autre de la membrane cellulaire de la plupart des cellules de l'organisme (85). Ils constituent l'énergie nécessaire pour le transport actif secondaire de nutriments (glucose, a.a.), de métabolites (citrate, lactate), d'ions (H^+ , Ca^{2+} , PO_4^{2-} , Cl^-) (85). Les gradients de Na^+ , maintenus par cette pompe, fournissent l'énergie pour la sécrétion d'acides organiques (PAH (acide p-aminohippurique), pénicilline) ou de diurétiques (furosémide, buméthanide) ou la concentration ou la dilution de l'urine (85). Etant donné que l'échangeur Na^+/H^+ existe dans les membranes endosomiales (156), le contenu cellulaire en Na^+ dicté par l'activité de la pompe peut influencer l'acidification endosomiale. Ainsi l'activité de ce transporteur localisé sur la membrane baso-latérale des cellules épithéliales pourrait influencer le transport des protéines dans les cellules rénales.

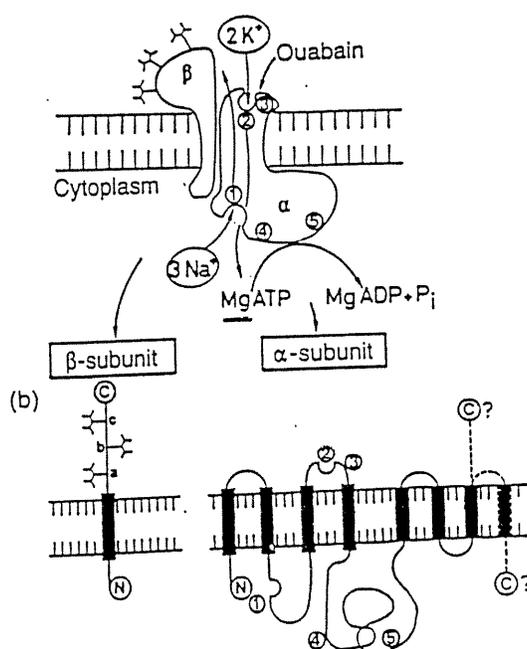
5.1.1. Structure de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase

Dans la membrane, la pompe a une orientation asymétrique (85). La protéine cristallise sous deux formes différentes: un monomère p1 et un dimère p21 (85).

P1 contient une sous-unité $\alpha\beta$ (unité asymétrique minimale de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase dans la membrane) alors que le complexe p21 représenterait une étape transitoire dans la formation du cristal monomérique sous la forme de deux unités $\alpha\beta$ (85). Les sous-unités α et β sont enchâssées dans les lipides et possèdent des segments transmembranaires (85).

Selon Lingrel, la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase est composée de deux sous-unités: une grande sous-unité α catalytique et une plus petite sous-unité β (Figure 2-19) (101). La sous-unité β est glycosylée dans le R.E. et serait impliquée dans l'intégration et l'orientation de la sous-unité α dans la membrane (Figure 2-19) (85). Cette sous-unité s'active pendant le trajet du site de synthèse vers la surface membranaire (85).

FIGURE 2-19 Structure de la $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase (135).



Il existe plusieurs isoformes de chacune de ces sous-unités: trois pour la chaîne α et au moins deux pour la chaîne β (101). L'isoforme $\alpha 1$ est trouvé dans toutes les cellules et prédomine dans le rein mais il se peut qu'il existe une ou plusieurs autres isoformes α dans ce tissu (101). La sous-unité $\beta 1$ se trouve dans tous les tissus et la sous-unité $\beta 2$ prédomine dans le système nerveux (101).

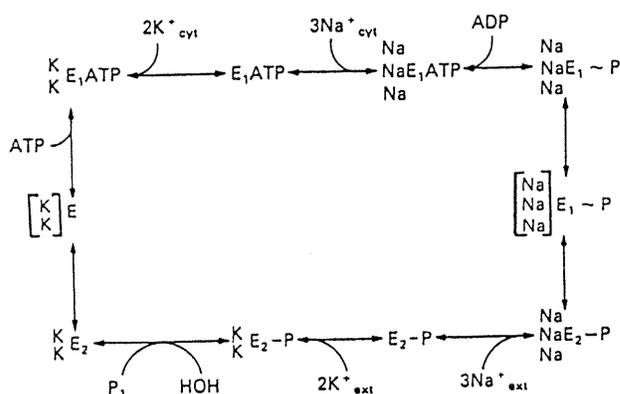
La structure primaire de la sous-unité α de la Na^+K^+ ATPase de mouton est composée de dix régions transmembranaires (101). La sous-unité β aurait seulement une région transmembranaire et la majorité de cette sous-unité serait extracellulaire (101).

Le dichroïsme circulaire montre que la structure de la Na^+K^+ ATPase consiste, en proportions égales, d'hélices α , de feuillets β et de formes spiralées au hasard (85).

5.1.2. Mécanisme d'action de la Na^+K^+ ATPase

La forme E_1 de la protéine peut lier trois Na^+ du côté cytoplasmique (Figure 2-20) (85).

FIGURE 2-20 Cycle de réactions E_1 - E_2 de la Na^+K^+ ATPase (85).



La liaison du Na^+ permet le transfert de $\gamma\text{-PO}_4$ de l'ATP à un groupe aspartyl de la sous-unité α (85) covalentiellement (128,152). Cette phosphorylation est suivie par la liaison de trois Na^+ intracellulaires au groupement phosphate (Figure 2-20) (85). Le Na^+ est

relâché à l'extérieur après la transition de la forme $(3 \text{ Na}^+) \text{ E}_1\text{-P}$ en $(3 \text{ Na}^+) \text{ E}_2\text{-P}$, forme caractérisée par l'exposition des sites cationiques au milieu extracellulaire afin de relâcher les Na^+ (85). La déphosphorylation est suivie par la capture de deux K^+ (Figure 2-20) (85).

5.1.3. Cinétique de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase

Dans le TCP, la pompe est responsable de 33 % de la réabsorption de solutés (85). Dans S_1 , la vitesse de réabsorption nette de solutés dépend de la quantité de glucose, a.a., phosphate et autres substrats transportés par des transporteurs dépendant du gradient de Na^+ qui sont situés sur la MBB (85). Les capacités maximales de réabsorption de glucose et d'a.a. sont proches de celle du transport du Na^+ qui dépend du contenu en $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPases dans les TP isolés (85).

<u>TCP</u>	
$\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase (pmoles/sec.cm):	7.6-17
Transport de Na^+ (pmoles/sec.cm):	19.5
Activité moléculaire:	
ATP/sec:	70-161
Na^+ /sec:	179

TABLEAU 2-II. Activité moléculaire de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase dans les tubules contournés proximaux microdisséqués de lapin (85).

Les transporteurs du glucose, a.a., phosphate pouvant être localisés dans les mêmes cellules, il est possible que ces trois substrats entrent en compétition pour l'énergie

de transport et que l'étape commune dans ce processus de réabsorption soit le maintien du $\Delta m Na^+$ par la pompe (85). Les deux ions sont transportés selon une réaction séquentielle, ping-pong (85).

5.2. ATPases de type V

Ces ATPases de type V sont associées aux organelles membranaires qui sont destinées à l'endocytose et l'exocytose et qui appartiennent au système vacuolaire central (151,169). Elles sont retrouvées dans les lysosomes, endosomes, vésicules tapissées, granules de réserve ou de sécrétion et les vésicules golgiennes (128). Stone y inclut les pompes à protons du RE (152). Ces ATPases hydrolysent l'ATP, générant un gradient de protons utilisé pour l'acidification de compartiments intracellulaires (85).

5.2.1. H^+ -ATPase de la MBB rénale

La pompe à protons de la membrane luminale des cellules épithéliales rénales, qui par la suite s'associe aux puits tapissés de clathrine, contient dix protéines de 12, 14, 15, 31, 33, 38, 42, 45, 56, 70 kDa (Figure 2-21) (57,68,134).

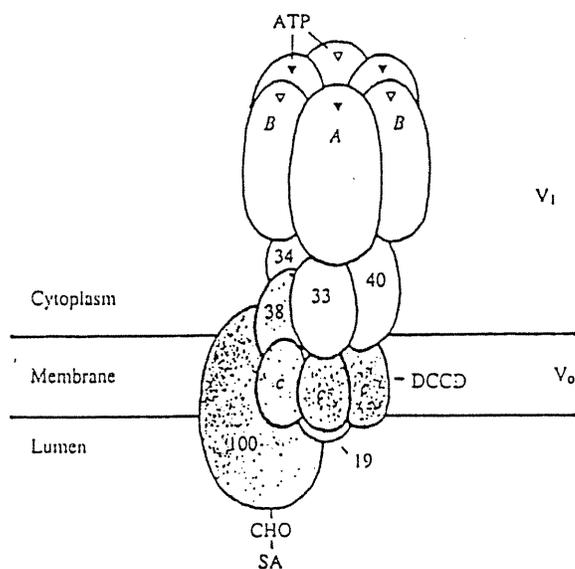
L'inactivation par radiation permet d'étudier le P.M. des protéines liées à la membrane sans solubilisation ni dissociation des composants membranaires (90). L'inactivation de l'enzyme résulte en une diminution de la V_{max} sans changement de K_m (90). La protéine existe dans la membrane sous forme de monomère (90). De ces études, il en résulte que le P.M. minimal de l'unité fonctionnelle de la H^+ -ATPase dans les MBB s'élève à 105 Kd (90).

Pour étudier les propriétés de la H^+ -ATPase présente dans les MBB, ces MBB sont isolées et purifiées (90). A cause de la complexité du cytosquelette des microvillosités in situ, les MBB se vésiculisent spontanément et adoptent majoritairement l'orientation physiologique (90). Le côté cytoplasmique des membranes forme l'intérieur

des vésicules isolées (90). L'ATP doit s'incorporer dans les vésicules afin de pouvoir provoquer le transport dépendant de cet ATP (90).

La H^+ -ATPase n'est pas l'unique mécanisme de sécrétion de protons au niveau de la MBB (90). La majeure partie de l'acidification luminale dépend du transport du Na^+ (80). Des études de microponction et de microperfusion sur des tubules microdisséqués montrent que seulement 25 à 30 % de la sécrétion luminale de protons est indépendante du Na^+ chez le lapin, donc produite par la H^+ -ATPase (90).

FIGURE 2-21 Structure d'une H^+ -ATPase présente dans les vésicules tapissées de clathrine (58).



5.2.2. H^+ -ATPase vacuolaire

Dans le TP, la H^+ -ATPase des vésicules tapissées de clathrine se présente sous la forme d'un grand hétéropolymère (>500 kDa) composé de sous-unités multiples.

La présence de la sous-unité de 100 kDa est contestée.

Ces sous-unités sont disposées en domaines fonctionnels qui peuvent chacun être le site de liaison de la bafilomycine, un inhibiteur irréversible de l'acidification (46).

Elle contient neuf sous-unités d'un P.M. de 17, 19, 33, 34, 38, 40, 58, 73, 116 kDa (Figure 2-21) (57). La stoechiométrie permet de dénombrer trois copies de chacune des sous-unités de 73 et 50 kDa, six copies de celle 17 kDa, une de chacune des sous-unités suivantes: 19, 33, 34, 38, 40, 116 kDa (57). Il est possible que de nombreuses variations de la structure de la pompe existent dans lesquelles le polypeptide de 116 kDa est absent et que ce dernier, extrêmement sensible aux protéases, soit clivé pendant la purification (151). Les P.M. rapportés sont souvent conflictuels dans la littérature. En effet, il est possible que l'apport de petites protéines de régulation à ces sous-unités et que des modifications post-traductionnelles influencent leur P.M. Ces polypeptides forment un seul complexe macromoléculaire parce qu'ils peuvent immunoprécipiter la globalité des polypeptides d'une préparation soluble de l'enzyme, en présence de détergent, en utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques de la H⁺-ATPase native de la vésicule tapissée (57). Selon ces auteurs, ces polypeptides correspondraient aux sous-unités de la pompe plutôt qu'aux contaminants qui copurifient avec l'activité (57).

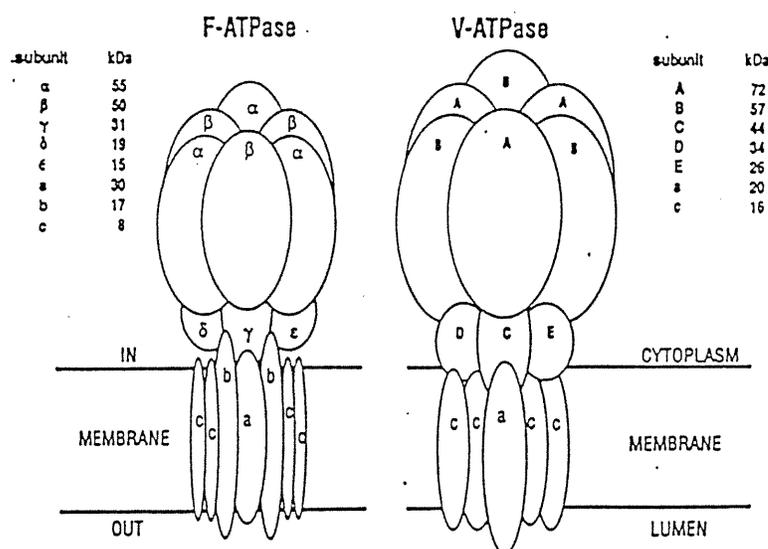
Les sous-unités de 60 et de 70 kDa des H⁺-ATPases vacuolaires paraissent être des protéines membranaires périphériques qui peuvent être dissociées de la membrane sans détergent (57).

La sous-unité de 73 kDa des H⁺-ATPases vacuolaires possède un site de liaison nucléotidique, probablement le site catalytique (57).

Un premier domaine responsable de l'hydrolyse de l'ATP périphérique est constitué d'au moins quatre sous-unités de 33, 40, 58, 70 kDa (46,151). Un second domaine est responsable du flux transmembranaire de protons (46).

Le sous-complexe constitué des sous-unités 17, (19), 39, 110 kDa de stoechiométrie 6:1:1 est retrouvé dans les vésicules couvertes par la clathrine. Cependant, il ne pourrait seul catalyser le mouvement des protons (46). La sous-unité de 17 kDa pourrait participer au flux de protons (46).

FIGURE 2-22 Structure de deux ATPases cationiques: F₁F₀-ATPase et H⁺-ATPase vacuolaire (118).



La conductance protonique est mesurée par l'extinction de l'absorbance de l'acridine orange et est médiée par la pompe ou plutôt par le sous-complexe formé par les sous-unités 17, 39, 110 kDa. Ce sous-complexe est le site de liaison de la bafilomycine produisant l'inhibition des pompes à protons vacuolaires (V_B) (46).

Dans le TP, les endosomes impliqués dans la réabsorption de protéines présentes dans l'urine primaire possèdent cette pompe (90). La H⁺-ATPase acidifie les environnements intra-endosomal et intra-lysosomal, ce qui est essentiel pour la dégradation des protéines et la dissociation des complexes récepteur-ligand (90,134).

5.3. ATPases de type F

Les pompes à protons de la majorité des bactéries, chloroplastes et mitochondries figurent parmi les ATPases de type F (Figure 2-22) (128).

Elles sont formées de plusieurs polypeptides regroupés en trois domaines: la sous-unité F₁ périphérique, peut lier le nucléotide et hydrolyser l'ATP; une tige la rattache

à la sous-unité F_0 membranaire. La F_0 facilite le mouvement du proton à travers la bicouche lipidique (151). La masse moléculaire s'élève à environ 500 kDa (119). Ces ATPases synthétisent ou hydrolysent un ATP pour transporter deux à trois protons, stoechiométrie variant selon les méthodes de mesure utilisées (119). Leur rendement est optimal à un pH de 8 (119).

5.4. Échangeurs Na^+/H^+

5.4.1. Généralités

L'échangeur Na^+/H^+ est un système de transport ionique qui est impliqué dans des processus cellulaires tels que la sécrétion de protons par les cellules du TP (83). Ce transporteur catalyse un échange de cations (83). Parmi les cations monovalents, le Na^+ peut s'échanger contre un H^+ dans les MBB (83). Lorsque le Na^+ entre dans la cellule pauvre en Na^+ via l'échangeur Na^+/H^+ , le H^+ est expulsé et le pH_i augmente (33). Par conséquent, il y a une augmentation du Na^+ intracellulaire qui sera ultérieurement expulsé par la Na^+-K^+ ATPase baso-latérale (33). La présence de cet échangeur dans la MBB et dans les endosomes (156) indique qu'il est susceptible de moduler l'acidification endosomiale.

5.4.2. Rôles des échangeurs Na^+/H^+

La fonction principale de l'échangeur du TP est d'acidifier le filtrat glomérulaire et de promouvoir la réabsorption de la majorité du bicarbonate filtré (61). L'échangeur est impliqué dans la régulation du pH intracellulaire, de la concentration intracellulaire de Na^+ , du volume cellulaire (61), de la réponse cellulaire aux facteurs mitogènes et humoraux et du flux transépithélial des électrolytes (81,94). L'activation de l'échangeur Na^+/H^+ par les facteurs de croissance joue un rôle important dans la

prolifération cellulaire, pendant la progression des cellules de la phase G_0/G_1 à la phase S du cycle cellulaire (61).

5.4.3. Isoformes des échangeurs Na^+/H^+

Le récent clonage de l'échangeur Na^+/H^+ par expression et par hybridation montre l'existence d'au moins cinq isoformes: NHE-1; NHE-2; NHE-3; NHE-4 et NHE-5 (93,149) (Figure 2-23). L'ADNc de NHE-1 a permis d'identifier les autres isoformes. Le NHE-1 a été identifié à partir de la membrane baso-latérale des cellules LLC-PK1 de porc (154), des cellules du TP de lapin (19,154,170) et des segments S1, S2, S3 des néphrons médians et juxta-médullaires (120). L'ARNm du NHE-1 ne s'exprime pas dans les S1 et S2 des néphrons superficiels de TP de rat ni dans les cellules rénales d'opossum (OK) (120,154,170). La taille de NHE-1 varie entre 815 et 820 a.a. et son poids moléculaire, de 91 à 92 kDa (170). Les NHE-1 de rat, de lapin et d'humain sont identiques à 90 % (24). Dans les cellules de tubules rénaux et dans les cellules non polarisées (64), NHE-1 joue un rôle primordial dans la régulation du pH intracellulaire, dans la prolifération cellulaire (70) et possiblement dans la régulation volumique (164) des cellules des S3 des TP (149).

Les ARNm des isoformes NHE-2, NHE-3 et NHE-4 sont majoritairement exprimés dans les tissus épithéliaux, ce qui suggère leur rôle spécifique dans des fonctions spécialisées de transport du NaCl (intestin et rein) et de sécrétion de H^+ liées à la réabsorption de HCO_3^- .

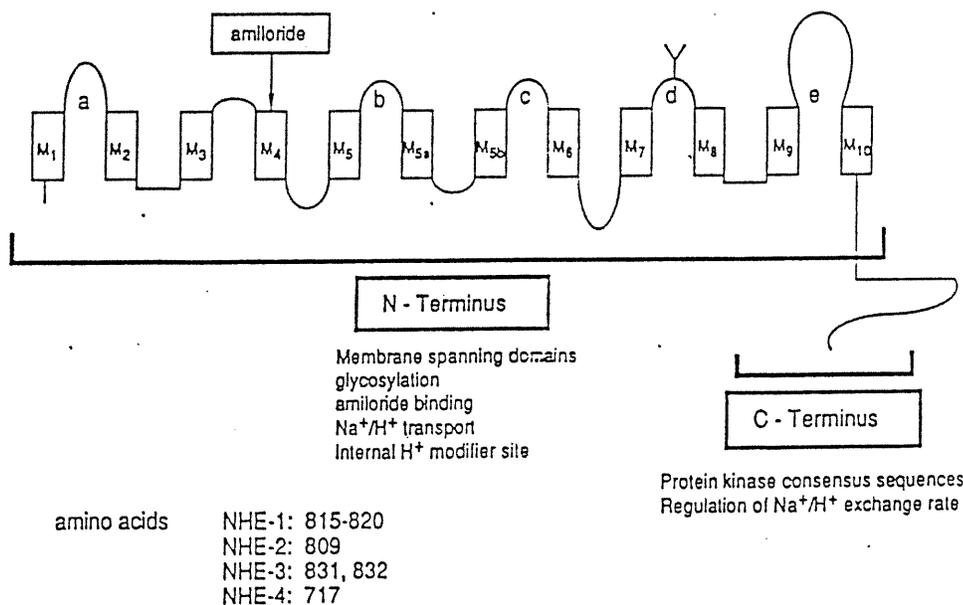
Le NHE-2 de lapin contient 809 a.a. et celui de rat, 813 a.a. (170). Soleimani et al suggère que le NHE-2 soit impliqué dans la régulation du volume des cellules des tubules collecteurs situés dans la médulla interne à cause de l'augmentation de son ARNm en réponse à l'hyperosmolarité (170).

Le NHE-3 humain a 834 a.a. et un P.M. de 93 kDa (24). Il se retrouve dans les MBB de TP de rein et d'intestin de mammifères (11,149). Il a un rôle majeur dans le transport transcellulaire du Na^+ et dans l'acidification urinaire (73,164). Son ARNm est

aussi exprimé dans une variété de tissus (testicules, ovaire, colon, prostate, thymus, cerveau, rate, placenta) mais en très faible quantité (24). L'ARNm du NHE-3 dans le rein et l'intestin d'humains mesure 6.7 Kb (24). Le NHE-3 de lapin est une protéine de 80 kDa qui a été détectée par "Western blot" et par immunocytochimie (18). Le NHE-3 de rat et de lapin a été détecté dans le rein et le tractus gastro-intestinal et dans le cerveau de rat (24,154). L'expression du NHE-3 de rat et de lapin n'a pas été étudiée dans l'ovaire, la prostate, le thymus, les leucocytes ou le placenta (24). Orłowski et al n'ont pas détecté d'ARNm de NHE-3 dans les testicules ou la rate de rat alors qu'il est relativement abondant dans les testicules humains et relativement bas dans la rate d'humain (24).

Les NHE-3 de rat, de lapin et d'humain sont identiques à 82 % (24). Les vésicules de MBB de TP de lapin et deux lignées de cellules épithéliales de TP, LLC-PK1 et OK, expriment toutes l'isoforme NHE-3 sur leurs membranes lumineales (24,149). La structure primaire du NHE-3 de lapin montre 831-832 a.a. et son P.M. est estimé à 93 kDa (170).

FIGURE 2-23 Structure de l'échangeur Na^+/H^+ (154).



Le NHE-4 est une protéine de 717 a.a. qui a été identifiée, jusqu'à présent, uniquement chez le rat (170). L'expression du NHE-4 est restreinte à la membrane basolatérale du tubule collecteur de la médulla interne, une région hyperosmotique (1200 mosm/kg d'eau). Il est activé seulement lors d'une hyperosmolarité mais cette activation est tout de même minime (170).

Le Northern blot démontre que le gène du NHE-5 est exprimé dans le cerveau, les testicules, la rate et les muscles striés mais il n'a pas encore été complètement cloné (93). La séquence d'a.a. déduite de deux de ses exons contenant 154 codons sont identiques à 59-73 % par rapport à celle des autres isoformes avec une plus grande similitude avec le NHE-3 (93).

En général, toutes les isoformes de l'échangeur présentent une partie NH₂ terminale (450 à 500 a.a.), une partie COOH terminale cytoplasmique (300 à 390 a.a.) (Figure 2-23) (154,170). La partie NH₂ est formée de dix (154) à douze hélices α transmembranaires (154,170) (M₁ à M₁₀) et de cinq boucles extracellulaires (Figure 2-23) (154) et comprend le site interne "senseur de H⁺" (6,120). De ces hélices, M_{5A} et B sont conservées dans toutes les isoformes, ce qui suggère que cette région peut être responsable de la liaison ou du transport du H⁺ intracellulaire ou du Na⁺ extracellulaire (Figure 2-23) (120,170). Le M₄ est le site de liaison de l'amiloride et de ses analogues substitués en position 5' du noyau pyrazine (170). La partie COOH ne semble pas essentielle au transport ionique (154) mais constitue le médiateur des signaux d'activation extracellulaires (facteurs de croissance, les hormones et le choc osmotique) (17,86,99,100,159-161). Ces signaux entraînent une augmentation de l'affinité du NHE-1 pour les H⁺ intracellulaires alors qu'ils modifient la vitesse maximale de transport du NHE-3 sans perturber son affinité pour les H⁺ intracellulaires (99).

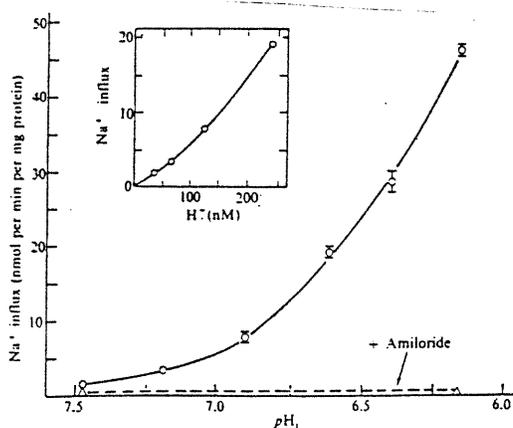
5.4.4. Caractéristiques des échangeurs Na^+/H^+

Le NHE-3 est étudié parce que c'est l'isoforme retrouvé dans les MBB de TP de rein de chien utilisés dans nos expériences. En outre, la plupart de ses propriétés se rapporte aussi au NHE-1 qui est l'isoforme qui a été le plus étudié jusqu'à présent.

Voici les principales caractéristiques de l'échangeur NHE-3 :

- 1- Le système est électroneutre avec une stoechiométrie 1:1 (5).
- 2- Seuls le Li^+ , le Na^+ et possiblement le NH_4^+ peuvent s'échanger avec le H^+ .
- 3- L'antiport est réversible. Le gradient de Na^+ entrant à travers la membrane apicale impose au système de fonctionner avec une entrée de Na^+ et une sortie de H^+ . Un gradient inverse de Na^+ produit alors une acidification intravésiculaire.
- 4- L'interaction de l'échangeur avec le Na^+ et le Li^+ externes suit une courbe de Michaelis-Menten. Le Li^+ montre une meilleure affinité ($K=1-2$ mM) pour l'antiport que le Na^+ ($K=5-10$ mM).
- 5- Une augmentation du pH externe augmente l'activité de l'échangeur Na^+/H^+ . Dans le rein, le H^+ externe se comporte comme un inhibiteur compétitif de la capture du Na^+ .

FIGURE 2-24 Effet du pH interne sur la vitesse d'entrée du Na^+ (5).



6- Une acidification intracellulaire active l'échangeur Na^+/H^+ . Il y a une coopérativité positive de l'activité de l'échangeur Na^+/H^+ à pH acide, ce qui peut impliquer la présence de plus d'un site de liaison intracellulaire pour le H^+ (Figure 2-24).

5.4.5. Sites de liaison sur les échangeurs Na^+/H^+

Selon Yun, la cinétique des échangeurs de mammifères, clonés et exprimés dans des cellules déficientes en activité d'échangeur Na^+/H^+ (PS120, cellules ovariennes de hamsters chinois (AP-1), cellules fibroblastiques de souris (LAP)) pour le Na^+ extracellulaire suit une cinétique simple de Michaelis-Menten avec un coefficient de Hill de 1, ce qui suggère un seul site de liaison pour le Na^+ extracellulaire (170). Le H^+ intracellulaire suit également une cinétique simple de Michaelis-Menten avec un coefficient de Hill de 2-3 (170). Ce coefficient démontre un modèle allostérique avec au moins deux sites de liaison indépendants (170). En plus du site de transport, il y a un site de modification pour le H^+ intracellulaire qui régule l'activité des échangeurs NHE-1, 2, 3 (120). L'activation allostérique par le H^+ interne augmente significativement l'affinité des échangeurs Na^+/H^+ de la membrane plasmique pour les H^+ intracellulaires afin de mieux faire face à un excédent de charges acides intracellulaires (5). Ainsi, l'énergie thermodynamique nécessaire à la sortie nette de Na^+ via l'échangeur Na^+/H^+ est moins importante à un pH interne de 6.9 qu'à un pH de 7.47 (5). Le H^+ interne active suffisamment l'échangeur pour compenser amplement cette perte d'énergie (5).

Il est possible que l'acidification puisse être couplée au transport du Na^+ par un mécanisme autre que l'antiport Na^+/H^+ (80). Aronson et al discutent d'autres mécanismes dépendant du Na^+ au niveau de la membrane luminale qui pourraient contribuer à la sécrétion de protons dans le TP (80), notamment le transport d'acides faibles tels que l'acide formique et l'acide acétique (4,75,139).

5.4.6. Activité des échangeurs Na^+/H^+

L'activité des échangeurs est modulée par différents stimuli (61). Les effecteurs se distinguent par leur action temporelle et leur action sur les propriétés biochimiques du système (61).

Les différentes isoformes de l'échangeur situé dans les TP sont contrôlées hormonalement par les taux circulants de thyroxine, de glucocorticoïdes (61) et de PTH (77,114).

5.4.6.1. Activateurs des échangeurs Na^+/H^+

Esters de phorbol

Les activateurs de PKC tels que les esters de phorbol (l'acétate-13 myristate-12 phorbol (AMP)), induisant une alcalinisation des cellules rénales d'opossum, augmentent l'activité du NHE-1 (61,120,153). Au contraire, le NHE-3 est inhibé par l'AMP (153).

pH

Dans la plupart des cellules, les pH interne et externe de l'échangeur Na^+/H^+ sont interdépendants (61). L'activité de l'échangeur est contrôlée non seulement par le gradient de pH membranaire mais également par les pH interne et externe (61).

Hormones

L'insuline (112) et les PGE_1 stimulent l'isoforme NHE-1 dans les cellules de TP, ce qui suggère que cette stimulation pourrait être un événement précoce dans le développement de l'hypertrophie cellulaire suite à une néphrectomie partielle (61).

PTH

Dans une lignée cellulaire de S2 de TP de lapin (RKPC-2), la PTH inhibe l'activité de leurs échangeurs Na^+/H^+ baso-latéral et apical respectivement (NHE-1 et NHE-2) (114). Dans les cellules OK transfectées avec de l'ADNc de NHE-1 de fibroblastes humains, la PTH (10^{-8} M) inhibe le NHE-1 apical mais n'a pas d'effet sur le NHE-1 baso-latéral (77).

Glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes augmentent l'activité du NHE-3 des vésicules de MBB (11). En effet, l'administration de dexaméthasone pendant un ou deux jours (600 $\mu\text{g}/\text{kg}$) double la quantité de l'ARNm du NHE-3, triple la quantité de la protéine NHE-3 (11) mais n'affecte pas l'ARNm du NHE-1 (11,12) ni la quantité de la protéine NHE-1 (11). Par contre, l'incubation de TP pendant trois heures avec 0.1 μM de dexaméthasone augmente l'activité de l'échangeur Na^+/H^+ sans augmenter la quantité des ARNm du NHE-1 et NHE-3 (12). De plus, le dexaméthasone en dose chronique augmente seulement la quantité de l'ARNm du NHE-3 (12). On peut donc conclure que l'augmentation rapide de l'activité de l'échangeur Na^+/H^+ induite par le dexaméthasone s'effectue par des mécanismes qui ne dépendent pas des variations des quantités des ARNm des NHE-1 et NHE-3 (12).

Etats physiopathologiques

L'activité de l'isoforme NHE-3 de l'échangeur Na^+/H^+ de la MBB du TP augmente dans l'acidose métabolique chronique, l'insuffisance rénale chronique, la néphropathie diabétique et dans divers modèles d'animaux d'hypertension essentielle (24,61). Cette activation ne modifie pas les propriétés cinétiques du système mais

provoque une augmentation de la vitesse maximale, qui est la conséquence d'une augmentation de la densité des antiports à la surface cellulaire ou d'une augmentation du "turn-over" des transporteurs préexistants (61).

5.4.6.2. Échangeurs Na^+/H^+ et les variations de l'osmolalité

L'effet de l'hyperosmolarité sur les isoformes NHE-1, NHE-2 et NHE-3 est étudié dans des fibroblastes transfectés avec PS120 (117), sur les vésicules de MBB de TP de lapin et sur deux lignées de cellules épithéliales de TP, LLC-PK1 et OK (149). L'activité de l'échangeur Na^+/H^+ est déterminée par spectrofluorométrie dans des cellules dont l'osmolarité de leur milieu varie entre 300 et 450 mosmol/kg (117). L'inhibition du NHE-3 par l'hyperosmolarité est réversible et rapide (86), ce qui pourrait provoquer une diminution de l'acidification tubulaire (pH entre 6 et 7.2 (86)) chez des patients présentant une hyperglycémie, une insuffisance rénale, une toxicité au méthanol ou à l'éthylène glycol (149). Par contre, elle stimule les NHE-1 et NHE-2 (86,117). Elle réduit de manière significative la vitesse maximale du NHE-3 mais n'altère pas son K_m pour les protons intracellulaires (117). La partie COOH terminale des NHE-2 et NHE-3 n'est pas nécessaire à l'inhibition de ces deux isoformes par l'hyperosmolarité (117,120).

L'effet prédominant d'une diminution de l'osmolalité sur les NHE-1 et NHE-2 se réalise par une variation du pK de l'échangeur, conduisant à l'inactivation de ces deux isoformes à un pH_i physiologique (86,149).

Il se peut que les cellules rénales épithéliales (LLC-PK1 et OK) à cause de la distribution polaire de leurs transporteurs le long du néphron, répondent différemment à la contraction osmotique (149). En effet, le NHE-3 présent dans les S1 et S2 du TP serait inhibé par l'hyperosmolarité alors que le NHE-1 présent dans les S1, S2, S3 des néphrons juxta-médullaires serait activé à cause de leur localisation proche de la médulla, une région où l'osmolarité varie beaucoup.

5.5. Les canaux chlore

5.5.1. Généralités

La présence de canaux Cl^- dans les endosomes est essentielle à la neutralisation du potentiel membranaire généré par la sécrétion de protons par la pompe pour acidifier l'espace endosomal. Il convient donc de les présenter ici brièvement. Le transport de Cl^- dans le TCP suivrait une voie paracellulaire et serait la plupart du temps passif (49). Les vésicules de la MBB du TCP sont grandement perméables au Cl^- , ce qui suggère un transport transcellulaire passif du Cl^- au niveau de la membrane apicale (49). Jusqu'à aujourd'hui, trois sortes de canaux Cl^- ont été identifiés et caractérisés dans le TCP (49). Le canal Cl^- dépendant de l'AMPc chez le lapin, le canal 30-pS activé par l'AMPc via la PKA chez le rat et des canaux CFTR (régulateur de la conductance transmembranaire de la fibrose kystique) (49).

Le CFTR est un canal Cl^- qui possède une conductance de 8 à 10 pS et présente une relation linéaire du courant en fonction du temps (142). Il génère des courants indépendants du temps et du voltage (142). Ce canal dépendant de l'AMPc est considéré comme un canal Cl^- (49). Par immunocytochimie, on a découvert que le CFTR est abondant dans le rein, surtout dans le TP, et est localisé dans la région apicale des cellules du TP (49). La réabsorption de Cl^- peut se produire en absence d'un gradient électrochimique de Cl^- , ce qui pourrait démontrer l'existence d'un transport actif via la voie transcellulaire (49).

Le canal 145-pS, sous conditions physiologiques, resterait ouvert la plupart du temps et contribuerait à stabiliser le potentiel de repos de la cellule (49). La grande efficacité et le débit du canal ionique Cl^- , par rapport à un transporteur ionique, le rendent apte à contrebalancer les changements de concentration cationique intracellulaire (49). Le potentiel inversé du Cl^- est proche du potentiel de repos et ses variations déterminent s'il y aura sécrétion ou accumulation de Cl^- dans la cellule (49). Des altérations de la

concentration intracellulaire de Cl^- modulent des processus cellulaires importants (49). La fonction cellulaire de ces canaux Cl^- n'est pas claire mais pourrait être reliée aux nombreuses fonctions des canaux Cl^- dans les activités cellulaires (stabilisation du potentiel membranaire, contrôle du volume cellulaire, acidification des vésicules intracellulaires et transport) (49). Le Cl^- entrant par ces canaux dans la cellule peut être évacué par la membrane baso-latérale (49).

6. INHIBITEURS DES TRANSPORTEURS DU TUBULE PROXIMAL

6.1. Bafilomycine A₁

6.1.1. Bafilomycine A₁ et H⁺-ATPase

La bafilomycine (BAF) est un antibiotique macrolide qui inhibe fortement et irréversiblement les H⁺-ATPases de type V in vitro (169). Il est constitué d'un noyau lactone et est isolé du *Streptomyces griseus sp. sulphurus* (23,165). Il existe également une BAF monoacétyl- et diacétyl-A₁, A₂ et diacétyl-A₂, B₁ et B₂, C₁ et C₂ (85,165). La BAF C₁ inhibe l'activité enzymatique de la Na⁺-K⁺ ATPase (23). La BAF A₁ est la plus spécifique pour inhiber l'activité de la H⁺-ATPase vacuolaire.

La BAF est efficace à des concentrations nanomolaires in vitro (169). Elle peut entrer dans les organelles de cellules vivantes via les membranes plasmiques sans les tuer (169). Elle peut inhiber in vivo l'acidification des lysosomes et la dégradation de la protéine endocytée (169).

Les effets de la BAF sur l'acidification des lysosomes sont testés avec l'orange d'acridine (169). Ce colorant est une base faible acidotrope qui est capturée par les cellules vivantes et qui s'accumule dans des compartiments acidifiés (lysosomes) (169). Quand les cellules sont mises en présence d'orange d'acridine, les noyaux et les

cytoplasmes deviennent vert fluorescent tandis que les grains cytoplasmiques, représentant les lysosomes acidifiés sont orange fluorescent, indiquant une forte acidification (169).

L'augmentation du pH intra-lysosomal est évaluée par la méthode utilisant le (DAMP) (169). Le DAMP est une base faible qui s'accumule dans les compartiments acides (169). Cette molécule, après fixation d'un aldéhyde, est détectable par la microscopie électronique utilisant des particules d'or liées à des Ac anti-IgG dans des structures multivésiculaires (lysosome) parce qu'il possède un dinitrophénol qui peut réagir avec un anticorps anti-dinitrophénol (169). Le traitement de cellules avec la BAF pendant une heure diminue nettement le nombre de particules d'or dans les compartiments étudiés (169). A pH=5.5, la densité des particules d'or dans des lysosomes contrôle s'élève à 41.3 par μm^2 alors que dans des lysosomes traités avec de la BAF, la densité diminue à 8.4 / μm^2 pour un pH=6.3 (169).

La BAF abolit la dégradation lysosomiale du facteur de croissance EGF qui est totalement endocyté, alors qu'elle n'affecte pas les étapes d'internalisation médiée par son récepteur ni son transport dans les lysosomes (169). On pense que l'arrêt de la dégradation de l'EGF par cet inhibiteur est relié à l'augmentation du pH intra-lysosomal (pH=6.3) bien que certaines enzymes protéolytiques présentes dans les lysosomes puissent fonctionner à un pH plus alcalin (169). Ceci suggère, néanmoins, que l'acidification des lysosomes est essentielle à l'activation des hydrolases lysosomiales (169). La morphologie des cellules et des organelles demeure normale lorsque la BAF est utilisée à des concentrations de l'ordre du micromolaire (169).

6.1.2. Bafilomycine A₁ et Na⁺-K⁺ et Ca²⁺ ATPases

La BAF A₁ inhibe modérément (1-4 $\mu\text{mole/mg}$) deux ATPases E₁/E₂ de type P: la Na⁺-K⁺ ATPase et la Ca²⁺ ATPase (23). Dans ce type d'ATPases, l'énergie produite par l'hydrolyse de l'ATP est couplée à la translocation de cations à travers la membrane

(23). L'enzyme subit des changements de conformation incluant la formation d'un intermédiaire phosphorylé (23). Il est à noter que les doses nécessaires pour inhiber les H^+ -ATPases vacuolaires sont 100 à 1000 fois inférieures à celles affectant l'activité des ATPases de type E_1/E_2 (23).

6.2. Amiloride

6.2.1. Généralités

L'amiloride, $C_6H_8ClN_7O$, est une pyrazinoylguanidine portant des NH_2 en position 3 et 5 et un Cl^- en position 6 du noyau pyrazine (94). Elle possède un P.M. de 229.65 (94). L'amiloride, un inhibiteur du transport électrogène de Na^+ dans les épithélia à jonctions serrées, inhibe également l'échangeur Na^+/H^+ (83). Dans les VMBB (vésicules de membrane de bordure en brosse), il s'agirait d'une inhibition compétitive (83).

6.2.2. Amiloride et canaux Na^+

Ces canaux sensibles à l'amiloride sont localisés dans les microvillosités des membranes apicales des cellules épithéliales rénales transportant le Na^+ (148). Le Na^+ traverse la membrane apicale par diffusion passive par ce canal et est activement expulsé de la cellule par une Na^+-K^+ ATPase présente sur la membrane baso-latérale (94).

L'amiloride, à une concentration inférieure à 1 μM , inhibe le transport de Na^+ lorsqu'elle est ajoutée à la solution baignant la membrane apicale (94). L'épithélium serré rénal contrôle le transport électrique trans-épithélial de Na^+ en tant que courant de court-circuit (I_{sc}) lorsqu'il est placé dans une chambre d'Ussing (94). La concentration d'amiloride requise pour provoquer l'inhibition à 50% de I_{sc} est utilisée pour mesurer son affinité apparente pour le canal Na^+ (94).

Cette mesure dépend:

1- de la concentration extracellulaire de Na^+

2- du pH extracellulaire

L'amiloride est une base faible qui interagit seulement sous sa forme protonée avec le canal Na^+ pour inhiber le Isc.

3- de l'accumulation intracellulaire d'amiloride

La forme non protonée de l'amiloride est assez soluble dans les lipides, peut lier et traverser facilement les membranes cellulaires, s'accumuler dans les cellules et altérer des mécanismes cellulaires.

4- du potentiel de la membrane apicale.

La variation de l'inhibition du canal dépend du potentiel de la membrane apicale (94).

Le canal Na^+ est le seul transporteur ionique inhibé par l'amiloride avec un $\text{IC}_{50} < 1 \mu\text{M}$ (94). A concentration physiologique de Na^+ , le IC_{50} pour l'inhibition du transport de Na^+ se situe entre 0.1 et 0.5 μM (94).

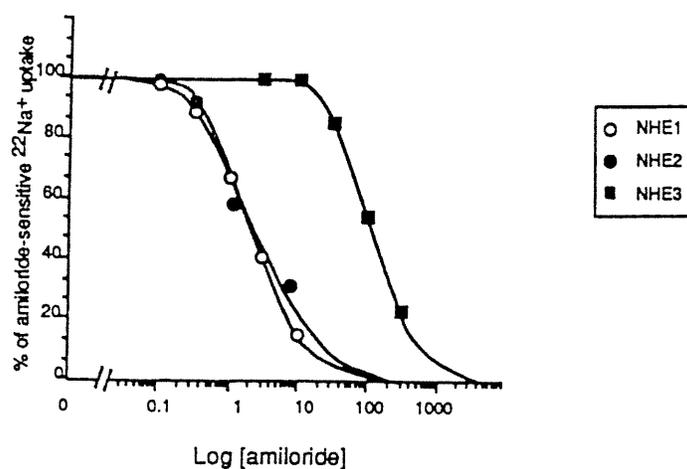
Cependant, l'opinion des chercheurs diverge sur les interactions de l'amiloride avec le canal Na^+ , certains affirmant qu'il s'agit d'une inhibition compétitive, d'autres, d'une inhibition non compétitive avec des sites de modification sur le canal Na^+ (83).

Par immunofluorescence indirecte et microscopie confocale, on observe que les canaux Na^+ sensibles à l'amiloride interagissent avec l'ankyrine, la fodrine et l'actine pour maintenir la polarisation de sa distribution au niveau des microvillosités de la membrane apicale dans les cellules épithéliales polarisées (148). Ces canaux ont une mobilité latérale limitée à cause d'un équilibre réversible entre la forme libre et liée des canaux ou de canaux confinés dans le microdomaine de la matrice du cytosquelette sous-jacent, ce qui suggère que la fodrine et l'ankyrine servent à restreindre la mobilité latérale du canal Na^+ (148). Il y a une association directe entre l'ankyrine et le canal Na^+ (148). Ce canal, par ses interactions avec l'ankyrine et la fodrine, fait donc partie d'un grand complexe moléculaire qui fournit un mécanisme de séquestration et d'accumulation de canaux Na^+ à la surface apicale et régule sa mobilité latérale (148).

6.2.3. Amiloride et les échangeurs Na^+/H^+

L'échangeur Na^+/H^+ se présente sous au moins deux isoformes selon des caractéristiques pharmacologiques distinctes: la première sensible à l'amiloride, le NHE-1 (12,149), et la seconde, résistante à l'amiloride, le NHE-3 (12,40).

FIGURE 2-25 Inhibition des isoformes NHE-1, NHE-2 et NHE-3 par l'amiloride (45).



L'isoforme NHE-3 humain oppose une résistance relative à l'inhibition par l'amiloride dont l'IC 50 équivaut à 49 μM et par l'EIPA dont l'IC 50 équivaut à 6.6 μM (24).

Le NHE-1 montre une IC 50 de 1 à 3 μM pour l'amiloride et de 20 nM pour l'EIPA (Figure 2-25) (170).

Le NHE-2 montre une sensibilité à l'amiloride similaire à celle du NHE-1 (1-3 μM) (170). L'IC 50 pour l'EIPA s'élève à 1 μM , valeur qui démontre que le NHE-2 est 50 fois moins sensible que le NHE-1 (Figure 2-25) (170).

Le NHE-3 est totalement inhibé par 1 mM d'amiloride (Figure 2-25) (5).

Plusieurs facteurs peuvent influencer l'inhibition de l'échangeur Na^+/H^+ par l'amiloride:

1- Le pH extracellulaire

C'est sous sa forme protonée que l'amiloride inhibe l'échangeur

2- La diminution du gradient de pH

3- L'accumulation intracellulaire d'amiloride

L'amiloride peut inhiber potentiellement cet échangeur par des mécanismes tels que l'inhibition des protéines intracellulaires (protéines kinases) ou l'augmentation du pH intracellulaire (94). Une diminution du pH intracellulaire ou intra-vésiculaire active l'échangeur par une augmentation de son affinité pour les H^+ internes sans changer le K_m pour le H^+ externe ou le K_i de l'amiloride (94).

4- La concentration extracellulaire de Na^+

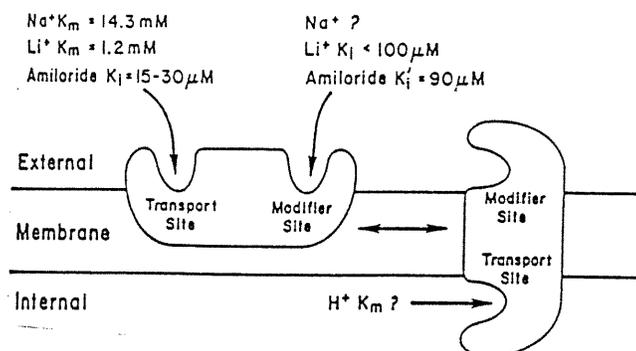
5- Les cations extracellulaires

Le IC_{50} (50 % de la valeur du courant de court-circuit) du NHE-1 atteint 3 μM lorsqu'il est mesuré en présence d'une basse concentration de Na^+ mais peut s'élever jusqu'à 1 mM en présence d'une forte concentration de Na^+ (94).

L'amiloride extracellulaire est un inhibiteur compétitif du Na^+ extracellulaire pour le site de liaison (154) et n'aurait pas d'effet du côté interne (29). Cette asymétrie fonctionnelle indique que le site d'interaction avec l'amiloride n'est accessible que de l'extérieur (29).

L'amiloride semble se lier à la partie NH_2 terminale de l'échangeur Na^+/H^+ (154). L'amiloride et ses analogues substitués en position 5' sont de puissants inhibiteurs du NHE-1.

Ces inhibiteurs entrent en compétition avec le Na^+ extracellulaire pour le site de liaison, quoiqu'une inhibition non compétitive avec ces mêmes produits a également été rapportée (83,170). En effet, Ives a émis l'hypothèse que ces échangeurs peuvent contenir un ou plusieurs sites de modification et sont plus complexes qu'un ionophore présentant un site unique de liaison pour les cations (83). En général, retenons que le concept d'une inhibition compétitive est bien accepté.

FIGURE 2-26 Modification des sites de l'échangeur Na^+/H^+ (83).

Les effets de l'amiloride justifient le concept d'un site de transport et d'un site de modification de l'antiport (83). L'amiloride produit une inhibition mixte de l'échangeur avec deux constantes d'inhibition caractéristiques de ce type d'inhibiteur (une pour le transporteur chargé, l'autre pour le transporteur non chargé) (Figure 2-26) (83).

Le meilleur composé est le N-5 éthylisopropylamiloride ou le N-5 méthylisobutylamiloride (81) qui est jusqu'à 200 fois plus puissant que l'amiloride (61) mais dont l'usage est limité à cause de sa piètre solubilité.

L'amiloride inhibe l'échangeur Na^+/H^+ du TP et le canal Na^+ épithélial du tube distal (TD) mais il n'est pas le meilleur (61) parce que peu spécifique (81). En effet, dépendamment de la dose utilisée, l'amiloride et ses analogues inhibent les canaux Na^+ , les cotransports pour les sucres et les a.a., la Na^+-K^+ ATPase et les canaux Ca^{+2} à faible seuil (81).

Nos expériences basées sur des TP en suspension ne montrent pas d'inhibition du transport des complexes albumine: BE et les résultats seront décrits et discutés ultérieurement.

6.2.4. Amiloride et les échangeurs Na^+ - Ca^{2+}

La concentration calcique intracellulaire est régulée dans les cellules eucaryotes par différents mécanismes tels que:

- 1- le transport de Ca^{2+} à travers les membranes:
- 2- le transport à travers les membranes des organelles intracellulaires
- 3- la liaison à des groupes chargés négativement (94).

Cet échangeur est un transporteur électrogène réversible qui échange trois Na^+ contre un Ca^{2+} (94). L'amiloride est un mauvais inhibiteur de cet échangeur avec un IC_{50} avoisinant 1 mM. Des concentrations relativement élevées d'amiloride sont requises pour inhiber complètement l'échangeur. L'amiloride interagit avec plus d'un site de liaison sur le transporteur (94).

6.2.5. Amiloride et la Na^+ - K^+ ATPase

La pompe Na^+ - K^+ ATPase est inhibée par l'amiloride à de très fortes doses (94). On ne sait pas encore si l'amiloride interagit avec la pompe par sa liaison à un site de liaison du Na^+ ou à un site de liaison de l'ATP, par un mécanisme qui est alterné ou si l'amiloride se lie à un site extra ou intracellulaire de la protéine (94). Le IC_{50} pour l'inhibition de l'activité ATPasique par l'amiloride est supérieur à 3 mM (94).

6.3. Inhibiteurs des canaux chlore

6.3.1. DIDS

Le DIDS et son analogue, le DIDS-H2, forment des liaisons covalentes avec les groupements nucléophiles des sites de transporteur du Cl^- (95). Il n'a pas d'effet sur le contenu tissulaire en électrolytes (les concentrations de Na^+ et K^+) mais, à très fortes

concentrations, il est un puissant inhibiteur de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase et de la $\text{Mg}^{+2}\text{-ATPase}$ (95). De même, le DIDS peut inhiber la $\text{Ca}^{+2}\text{-ATPase}$ des membranes érythrocytaire et baso-latérale des TP de rat et de lapin (16). Cependant, la respiration tissulaire mesurée dans du tissu frais de cortex ne serait pas affectée par le DIDS (1 mM) (95).

Dans les TP de rat, les stilbènes sont des inhibiteurs potentiels de transporteurs anioniques tels que l'échangeur $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-$ et du transport du PAH (p-aminohippurate) lorsqu'ils sont appliqués du côté baso-latéral de l'épithélium mais sont inefficaces du côté luminal (71). Les membranes baso-latérales rénales donnent des vésicules configurées à l'endroit (orientation physiologique) et à l'envers (95). L'inhibition maximale de l'échangeur $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-$ atteinte par le DIDS suggèrerait que 65 % de ces vésicules se présentent avec l'orientation physiologique puisque le DIDS n'agit que sur le site externe des transporteurs du Cl^- (71). Les vésicules de MBB de reins de rat, lapin et chien sont aussi, en majorité, d'orientation physiologique (95), ce qui est démontré par l'utilisation de techniques de cryofraction et des méthodes immunologiques. La non-spécificité du marquage des membranes baso-latérales par liaison covalente au DIDS peut ainsi résulter totalement ou partiellement du fait que la préparation est un mélange de vésicules d'orientations différentes (95).

L'acidification des compartiments vacuolaires nécessite la présence d'un anion perméant tel que le Cl^- (57). En l'absence de Cl^- , l'acidification endosomiale dépendant de l'ATP est complètement bloquée (57). Cet anion pourrait être nécessaire à la dissipation du potentiel membranaire établi par le transport de H^+ via un flux similaire de Cl^- (57). Cependant, l'action de l'inhibiteur anionique DIDS doit être interprétée avec prudence parce que cette substance non seulement bloque les flux de Cl^- mais est capable, à forte concentration, de bloquer directement l'activité ATPasique de la pompe à protons de membranes solubilisées dans du détergent (57).

Par un procédé de déshydratation/hydratation, des vésicules géantes dont le diamètre dépasse 200 μm peuvent aisément être générées (140). Les membranes des compartiments sub-cellulaires sont accessibles à la technique de patch-clamp et les

canaux ioniques localisés dans les membranes intracellulaires peuvent être étudiés après incorporation dans les bicouches lipidiques (140). L'inhibition de la perméabilité anionique des vésicules entourées de clathrine et des endosomes rénaux conduit à une diminution de la capture de H^+ dépendante de l'ATP dans les vésicules. Cette observation indique une corrélation fonctionnelle entre la pompe à H^+ et la perméabilité anionique (140). Cependant, la H^+ -ATPase, provenant des vésicules tapissées de clathrine, purifiée et reconstituée dans les liposomes, montre qu'un transport de H^+ est possible en l'absence de Cl^- , si on fournit un mécanisme capable de dissiper le potentiel membranaire généré pendant la capture de H^+ (57). La conductance Cl^- qui compense normalement les charges positives dans les vésicules tapissées intactes n'est attribuée à aucun composant de la pompe à protons purifiée puisque le transport de protons par la H^+ -ATPase, en présence de Cl^- mais en l'absence de K^+ et de valinomycine, ne se produit pas, d'où l'intérêt d'une autre protéine pour promouvoir le flux de Cl^- (57). Donc, le contrôle de l'acidification vacuolaire ne se finalise pas nécessairement avec la H^+ -ATPase mais plutôt par une modification d'une protéine accessoire requise pour l'acidification, telle que la protéine responsable de la conductance passive du Cl^- (57). Par down-régulation de l'activité de cette conductance au Cl^- , il est possible d'inhiber progressivement le pompage de protons par la H^+ -ATPase localisée dans la même membrane (57). Néanmoins, une équipe de chercheurs rapporte qu'une stimulation partielle de l'activité de l'ATPase solubilisée dans du détergent par le Cl^- (absence d'un compartiment fermé), ce qui suggère l'existence d'un site de liaison anionique qui participe à l'activité de la pompe à protons (57).

6.3.1.1. Effets cellulaires du DIDS

L'addition de 0.1 mM de DIDS ou de SITS dans le bain montre une diminution de la probabilité d'ouverture des canaux (P_0) de 0.9 à 0.46 (140). Un mM de DIDS provoque un blocage complet du canal (140). Alors que l'effet du DIDS à une

concentration de 0.1 mM est complètement réversible, à 1 mM, l'effet est irréversible (140). La capture électrogène de H^+ induite par l'ATP dans les vésicules est réduite par le remplacement du Cl^- dans le milieu par de plus grandes molécules anioniques et/ou par addition de DIDS (140).

Le DIDS bloque le canal 30-pS mais probablement pas le CFTR (49,142). Dans le TCP, on pense qu'une proportion élevée de CFTR est localisée dans les vésicules proches de la membrane (49).

Le DIDS, ajouté du côté cytoplasmique du canal dans les membranes à configuration inversée (patch-clamp), inhibe l'activité du canal avec une constante d'inhibition K_i de 0.9 μM (49).

6.3.2. SITS

Le SITS est un puissant inhibiteur de l'échangeur Cl^-/HCO_3^- dans l'érythrocyte (95). Le SITS périlitubulaire inhibe la réabsorption nette de HCO_3^- dans le TP de rat (16). Il est efficace seulement quand il est appliqué du côté baso-latéral (155). Ceci indique qu'il agirait sur la sortie d'anions du côté baso-latéral (155). Le SITS bloque aussi la sortie passive contra-latérale d'anions dans la vessie de tortue (155).

Le SITS semble inhiber la sortie cellulaire du HCO_3^- et secondairement, l'échangeur luminal Na^+/H^+ et conséquemment, la réabsorption du Na^+ (155). Fromter rapporte que le transport du H^+ localisé dans la MBB peut être indépendant du transport actif de Na^+ et donc du gradient de Na^+ à travers la MBB (155). D'autre part, Murer a trouvé un échangeur Na^+/H^+ dans les vésicules isolées de MBB (155). Cet échangeur demeure présent si la sécrétion de H^+ est contrôlée soit par un flux de Na^+ vers l'intérieur de la cellule et/ou par l'action d'une ATPase, possiblement l'ATPase stimulée par le HCO_3^- et localisée dans la MBB (155). Si la réabsorption de Na^+ et la sécrétion de H^+ forme un système à contre-courant passif dans la MBB, une inhibition de la Na^+-K^+ ATPase et de la sécrétion de H^+ pourrait inhiber la réabsorption de Na^+ (155). Dans les

épithélia lâches, le transport actif de tout soluté peut être évalué par la mesure de sa perméabilité et de sa ddp (différence de potentiel) électrochimique (aucun flux net): ou bien le SITS inhibe davantage le transport actif s'il est appliqué du côté péri-tubulaire au lieu du côté luminal (le potentiel change), ou bien il inhibe le transport seulement lorsqu'il est appliqué du côté péri-tubulaire (si le potentiel demeure constant) (155). Il est plus probable que le SITS diminue seulement le transport actif du tampon (HCO_3^-) et ne change pas les perméabilités (155). L'absorption de Na^+ dépend de la présence de HCO_3^- et des tampons voisins (155). L'ajout de SITS au niveau baso-latéral change les caractéristiques du tubule droit proximal de lapin perfusé in vitro (16). Une augmentation de la sélectivité au K^+ de la membrane baso-latérale entraîne une interaction avec le Ca^{+2} intracellulaire (16). Si le SITS inhibe la pompe Ca^{+2} , une augmentation du Ca^{+2} cellulaire pourrait en résulter avec une augmentation de la perméabilité au K^+ (16). Le SITS induit un gonflement marqué des cellules via un effet sur la perméabilité au K^+ (16). Cet effet n'est pas quantifié mais est visible au microscope (16). Les cellules s'arrondissent, perdent la définition de leur MBB et présente une apparence granulaire (16). Ces cellules maintiennent cependant leur potentiel intracellulaire stable à -80 mV (16). Quand le SITS (1 mM) est appliqué des deux côtés de la cellule, il inhibe le transport transcellulaire de H^+ de 72 % et diminue le J_{Na^+} de 38 % quand il est appliqué seulement du côté péri-tubulaire (155).

Le SITS n'affecte pas significativement la sécrétion de H^+ ni l'absorption de Na^+ lorsqu'il est placé au niveau luminal (155). Il n'a aucun effet sur les autres types de transport quel que soit son endroit d'application (155).

6.3.3. DNDS et NPPB

Le DNDS, de même que le NPPB, bloque les canaux ORCC (Outward Rectifying Canal Chlore) (158). Le DNDS, agit comme un bloqueur de canaux ouverts avec une concentration effective (K_i) de $\pm 3 \mu\text{M}$ (158). L'activité maximale du DNDS est

due aussi bien à ses régions électronégatives des pôles 4, 4' qu'à sa symétrie (158). En plus des régions électronégatives autour des deux sulfonates, les pôles 4, 4' du DNDS sont électronégatifs à cause de l'attraction électronique élaborée par les deux groupes nitro (158). En substituant le ou les groupes attracteurs nitro du DNDS par des groupes aminés donateurs d'électrons, il y a une diminution dramatique du potentiel d'inhibition (158). A pH neutre, il existe en solution sous forme d'anions divalents (158). Il possède une région électronégative aux environs des 2, 2' sulfonates (158).

Le DNDS est plus puissant que le NPPB au niveau de la membrane externe ou du côté extracellulaire du canal. Ces deux inhibiteurs semblent partager un site commun de liaison (158).

6.3.3.1. Effets cellulaires du DNDS et du NPPB

Le DNDS, ajouté du côté cytoplasmique du canal dans les membranes à configuration inversée (patch-clamp), inhibe l'activité du canal (49). Il bloque totalement l'activité du canal avec une constante d'inhibition K_i de $10 \mu\text{M}$ (49).

Le NPPB, un puissant bloqueur des canaux Cl^- , inhibe la capture de Cl^- dans les vésicules (140). Le potentiel membranaire induit par les H^+ -ATPases peut être dissipé par un courant Cl^- et par conséquent, il en résulte une entrée nette de H^+Cl^- (140). Dans les endosomes rénaux, il y a seulement une petite conductance au Cl^- en absence d'ATP et une augmentation de la conductance après ajout d'ATP (140). Il existe donc un arrangement parallèle de H^+ -ATPases et de canaux Cl^- dans les membranes vacuolaires et donc un étroit couplage entre les canaux Cl^- et les H^+ -ATPases et un rôle possiblement régulateur de l'ATP sur l'activité des canaux (140).

ARTICLES

Albumin transport by isolated renal tubules.

M. Rengel ¹, M.O. Richard ², V. Marshansky ² and P. Vinay ²

¹ Servicio de Nefrologia, Hospital General Gregorio Maranon,
Calle Dr.Esquerdo 46, 28007, Madrid, Spain

and

² Laboratoire de Néphrologie, Centre de Recherche Louis-Charles Simard
Hôpital Notre-Dame, 1560 Rue Sherbrooke Est, Montréal, Québec, H2L 4M1,
Canada.

Telephone: (514) 876-6892

Fax: (514) 876-5315

Short title: Albumin transport in renal tubules.

Key words: albumin, endocytosis, Evans blue, tubules.

Summary

Albumin (Alb) is reabsorbed by the proximal tubule in part via a receptor-mediated endocytic process. We have evaluated albumin transport *in vitro* by following the cellular accumulation of Evans Blue (EB) bound to albumin (7:1 EB:Alb molar ratio) in suspensions of tubular segments of proximal or distal origin tissue. Accumulation of EB was measured photometrically after extensive washing and solubilization of the tubules. In presence of 12.5 mg/mL albumin, EB accumulates with time in lysosomes of proximal tubules, a process which is markedly reduced when EB is presented without albumin. This process is suppressed by lowering the temperature (20°C and 4°C), by hyperosmolarity (600 mOsm), by anoxia and by various inhibitors (cytochalasin B, colchicine, 4-pentenoate, KCN) but not by others (creatinine, ionomycin, iodoacetate, enalaprilate, lysinopril, captopril, angiotensin II). Albumin transport was also inhibited by saturating albumin with EB (70:1 EB:Alb molar ratio; reduction of the net albumin cationic charges). Albumin transport by proximal tubules followed saturation kinetics (apparent $K_m = 43$ mg/mL, apparent $V_{max} = 11.2$ mg/g.wet wt . hour). A significant, but smaller albumin transport was observed in thick ascending limbs and in papillary collecting ducts. It is concluded that tissue accumulation of EB bound to albumin can be used to estimate the transport of albumin by suspensions of kidney tubules *in vitro*.

Introduction

Proximal tubular cells are known to reabsorb filtered proteins including albumin. Studies on perfused kidneys [15], perfused tubules [16, 21-23] and cultured cells [24, 27] have defined the mechanisms of this process occurring through both fluid-phase and receptor-mediated endocytosis. The techniques used to study this important process in perfused kidney or tubules, are cumbersome while cultured cells present significant differences with intact proximal cells. We have developed a simple technique to evaluate protein transport by a suspension of proximal tubules *in vitro*. This technique relies on internalization of EB:albumin complexes with secondary accumulation of EB in the endosomes and lysosomes of the cells. This principle was already used to study the transport of protein:EB complexes by isolated proximal tubular cells [27]. We demonstrate that this approach can be used to study the regulation of protein transport under physiological and pathological conditions by suspensions of defined segments of the nephron.

Methods

Reagent

Evans Blue, cytochalasin B, colchicine, 4-pentenoate, ionomycin, iodoacetate, lactate, pyruvate, glucose and sucrose were obtained from Sigma Chemicals Co. (St Louis, MO, USA). Albumin and angiotensin II were from ICN Biomedicals Inc. (Costa Mesa, CA, USA). Cytochalasin B, colchicine, creatinine were provided from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA). KCN was from Fisher Scientific (Nepean, ON, Canada). Collagenase A and hyaluronidase were provided by Boehringer-Maunheim (GmbH, W.-Germany). Enalaprilate and lysinopril were obtained from Merck Frost (Montréal, PQ, Canada). Captopril was from Squibb (Montréal, PQ, Canada).

Preparation of tubule suspensions from dog kidney

Cortical tubules (CT), thick ascending limbs (TAL) and papillary collecting ducts (PCD) were prepared by collagenase and hyaluronidase digestion of dog kidney cortex slices as previously described [25]. All animals were cared for in accordance with the principles and guidelines of the Canadian Council of Animal Care. The suspension of cortical tubules obtained was used as such without further purification, and consisted mainly of proximal tubules (> 85 %) [25]. Purified tubules (around 80 mg wet wt / mL) were suspended and stored in ice-cold Krebs Henseleit saline (KHS) freshly gassed with 5% CO₂:95 %O₂.

Preparation of albumin-Evans Blue complexes

Fatty-acid free bovine albumin (fraction V, ICN Biomedicals Inc.) (125 mg/mL) was dissolved in Krebs-Henseleit Saline (KHS). Evans Bleu (EB) was added to albumin (Alb) to obtain a 1:10, 1:2 or 1:1 EB:Alb ratio (w/w) (i.e. 7:1, 35:1 and 70:1 molar ratios).

Measurement of albumin transport by intact proximal tubules

Tubules were incubated for 0, 15, 30, 60, 120, 180 min. in a final volume of 4 mL gassed KHS in the presence of adequate metabolic substrates (lactate 10 mM + pyruvate 0.1 mM for cortical tubules and TAL; glucose 5 mM for PCD) at 37°C, 22°C or 4°C. The final concentration of albumin in the flasks was varied from 0 to 70 mg/mL using white albumin or EB:albumin complexes. When required, effectors were included in the incubation medium (sucrose, KCN, cytochalasin B, colchicine, creatinine, 4-pentenoate, ionomycin, iodoacetate, angiotensin II, enalaprilate, lysinopril, captopril). After the incubation, the flasks were emptied in tubes and 3 mL of KHS containing 1% white albumin was used to wash the residual tubules out of the incubation flasks. The washing was added to the tubes which were centrifuged at slow speed (1.000 rpm) for 30 sec in order to spin down the tubules.

The supernatant was removed by aspiration and the tubular pellet was resuspended with 3 mL 1% white albumin. This procedure was repeated three times. The tubules were then resuspended in 1 mL 1% albumin and centrifuged in an Eppendorf microcentrifuge for 4 min. at 8 000 rpm. The supernatant was discarded and the tubules were finally resuspended in 1 mL 1% SDS (sodium dodecyl sulfate), thoroughly mixed and left overnight to solubilize the proximal tubules. In some experiments, Triton X-100 was also used as detergent. The extract was added to tubes containing 1 mL 1 M NaOH, 1 mL ethanol and 0.95 mL H₂O to obtain a final volume of 4 mL.

Following mixing, the optical density of the diluate was measured at 595 nm (specific absorption of EB) and 800 nm (to measure the light absorption and/or scattering due to turbidity). No absorption of EB occurs at 800 nm. Flasks containing tubules incubated without EB were included in each experiment in order to calculate the non-specific absorbance due to turbidity of tubular proteins recorded at 595 nm as predicted from measurements at 800 nm. The correction applied to the optical density of each tube at 595 nm was minor and usually below 5% of the EB signal. The specific absorbance was then

calculated and converted in terms of micrograms of EB using a calibration curve. The EB bound or transported by the tubules was calculated by subtracting the binding component estimated from the value measured at time zero from that found after 15-180 min incubation. The transport is expressed as μg EB accumulation / g wet wt of proximal tubules. The amount of albumin transported was then calculated from the EB:Alb ratio.

Electron microscopy and immunolabeling

After preincubation of isolated dog proximal tubules in presence of albumin, the tubules were fixed with 2.5% glutaraldehyde, post-fixed with osmium tetroxide and processed for routine electron microscopy. Immunodetection of the albumin taken up by the tubules was performed as previously described [2, 14]. Briefly, a rabbit anti-bovine albumin antibody (1/200 dilution, from Cappel, Organon Teknika, Scarborough, ON, Canada) was used as first antibody followed by the protein-A gold complex. Neutralization of the antibody with an excess of antigen (1 mg/mL bovine serum albumin) or substitution by normal rabbit serum in the labeling protocol was performed to confirm the specificity of the immunolabeling.

Statistics

Statistical analyses were done using Stat-View 512+™ and SuperAnova™ (Abacus Concepts, Inc.). Kinetic parameters were calculated using the program Enzfitter (Biosoft, Elsevier).

Results

Evans Blue:albumin complexes

When EB is added to albumin, an immediate strong non-covalent binding is observed. Albumin is able to bind from 1 to 70 molecules of EB per molecule [1, 6]. We have usually worked with a 1:10 EB:Alb (w/w) ratio i.e. a 7:1 molar ratio. At this ratio, the fraction of free EB, as measured with 0.25, 0.5, 1.5, 3 and 6 mg EB / mg albumin by equilibrium dialysis or following deproteinization of blue albumin with perchloric acid, is 1.7% of the total, 98.3% of EB remaining bound to albumin. Thus 0.021 mg/mL of free EB is present in flasks containing 1.25 mg EB:12.5 mg albumin / mL.

Binding of EB during incubation of cortical tubules with EB without albumin

Figure 1 (Curve 1) demonstrates that some small binding of EB to cortical tubules could be observed when a low concentration of free EB (0.0125 mg/mL) is presented to tubules. This process is completed in less than 1 min. and the binding remains identical for 180 min. A major fraction of EB (88%) remains unbound at all times (not shown). We have therefore chosen to work with an EB:Alb ratio insuring such a low free concentration of EB (0.02 mg/mL). If the concentration of free EB is increased to 1.25 mg/mL (Figure 1, Curve 2) or 1.56 mg/mL (Figure 1, Curve 3), an immediate and larger binding is observed followed by some progressive increment of EB association to tubules, reaching 600 $\mu\text{g/g}$ wet wt after 180 min. (Figure 1). Only one per cent of the EB is now associated with the tissue. With free EB at 6.25 and 12.5 mg/mL (Figure 1, Curves 4 and 5), a progressive accumulation of EB follows the large initial binding. Thus, a considerable direct binding of EB can occur to tubules in presence of large amounts of free EB and this process leads to accumulation with time, a feature more apparent at highest concentration of EB.

Accumulation of EB during incubation of cortical tubules with EB:albumin complexes

If EB:albumin complexes (1.25 mg EB:12.5 mg Alb / mL) are added in the flasks while reproducing the same low concentration of 0.02 mg/mL free EB, a continuous cellular accumulation of EB is now observed for 15-180 min. (Figure 2, Curve 3). The presence of albumin have stimulated EB accumulation with the tubules well above the value seen with EB alone (Figure 2, Curve 1). This process is due to internalization of EB:albumin complexes and not to EB binding (see below), through the physiological mechanisms of albumin transport leading to EB accumulation in lysosomes. The accumulation of EB is directly related to the amount of tubules (8.2-82 mg wet wt) present in the incubation medium (Figure 3).

The transport and accumulation of EB:albumin complexes was measured at increasing concentrations of albumin insuring the same EB:Alb ratio. The transport was corrected for initial binding by subtracting the value of EB observed at time zero. EB accumulation was then converted into albumin transport (Figure 4). After an initial rapid accumulation phase, the transport process became linear with time (15-180 min.) and related to the amount of albumin presented to the tubules. Fig 4 shows that the accumulation of EB i.e. the transport of EB:albumin complexes, increases with albumin concentration. Comparable experiments demonstrate that a saturation kinetics is observed with an apparent K_m for albumin at 43 mg/mL and a V_{max} of 11.2 mg/g . hour (Figure 5).

Experiments were performed to examine the competition of white (without EB) and blue (7:1 EB:Alb) albumin for transport. The same final concentration of albumin (12.5 mg/mL) was achieved by adding decreasing volumes of EB:Alb and increasing volumes of white albumin. Reducing the amount of EB:albumin complexes reduced EB accumulation (Figure 6, Curve 1). However, the calculated net transport of albumin was little affected by this change (Figure 6, Curve 2).

Modulation of albumin transport by variation of charges and by osmolarity and temperature

The effect of increasing the amount of EB bound to each molecule of albumin i.e. of the "specific activity" of EB:albumin complexes (7:1, 35:1 and 70:1 molar ratio) on albumin transport was examined at the same albumin concentration. Increasing the EB:Alb ratio from 7:1 to 35:1 greatly reduced the albumin transport (Figure 7, Curves 1 and 2). A maximal molar ratio of 70:1 nearly abolished apparent albumin transport with time (Figure 7, Curve 3).

The accumulation of EB:albumin complexes studied with an optimal EB:Alb molar ratio (7:1) was drastically reduced by increasing osmolarity from 300 to 600 mOsm with NaCl or sucrose (Figure 8, Curve 2) or by reducing the temperature from 37°C to 20°C and 4°C (Figure 9).

Action of various inhibitors on albumin transport

Interference with tubular energy supply using anoxia as well as incubation of tubules in presence of 0.1-0.25 mM KCN or 0.5-10 mM 4-pentenoate but not 0.1-1 mM iodoacetate suppressed EB:albumin accumulation (Table 1). However, a strong intracellular binding of EB, well above that normally measured with intact cells, was observed when the tubular cells became no longer viable (not shown).

Creatinine, used as a negative control, had no effect on accumulation of EB:albumin complexes. A microtubular poison, cytochalasin B (100-200 μ M), suppressed EB:albumin accumulation (Table 1) while colchicine (2 mM) or ionomycin (2-20 μ M) had no effect. Various ACE inhibitors such as captopril (0.25-10 mM), enalaprilate (0.5-2 mM) or lisinopril (0.25-10 mM) had also no effect on albumin transport by proximal tubules in suspension.

Electron microscopy

After a short (<5min.) exposition to albumin, the localization of albumin in the brush-border membrane was immunologically demonstrated by the presence of gold beads (Figure 10, Panel A). After 30 min., a significant number of beads were lining the internal membrane surface of many endosomal vesicles (Figure 10, Panel B). After 60 min., the gold beads were found mostly in the endosomal space indicating that the receptor:albumin complexes were dissociated (Figure 10, Panel C).

Transport in TAL and PCD tubules

When transport of albumin was tested in TAL and PCD tubules devoid of brush border membrane, a significant but less pronounced than by proximal tubules accumulation of EB was observed with both TAL (Figure 11, Curve 2) and PCD (Figure 11, Curve 3) tubules. Thus, the overall albumin transport is not exclusively related to proximal tubules.

Discussion

Albumin has a strong affinity for EB [1, 13]. This property has been widely used in the past in dogs [1, 10, 12], rats [7] and man [5, 8, 10, 13] to measure the albumin distribution volume *in vivo*. In this paper, we exploit this property to measure indirectly the transport of albumin by proximal and distal tubules. This approach was already used by Wilde et al [27] using cultured proximal cells. Our experiments were performed with a suspension of tubules with open lumen [25], allowing contact of albumin with both luminal and basolateral membranes i.e. the transport process to occur at the both sides. In order to distinguish EB binding to the tissue from transport of EB:albumin complexes, studies of binding of free EB to tubules were performed.

When free EB is presented at low concentration to viable tubules in absence of albumin, an immediate binding of EB to tubular cells occurs and a small fraction (12%) of the available free EB becomes bound to the cell membranes. This process is completed instantaneously, indicating the presence of high affinity binding sites for EB on proximal tubules cellular membranes. At higher concentrations of EB, lower affinity sites are uncovered and the binding of EB to tubules increases. With higher concentrations of free EB, however, a progressive increment of EB association with the tissue is also noted with time. This is thought to be related to transport of EB:proteins complexes formed with endogenous proteins remaining from the preparation of the suspension (collagenase, albumin, renal proteins leaking from tissue slices) (see below). Alternatively, the movement of membrane from the cell surface to internalized endosomes could explain this observation.

In order to minimize the contribution of non-specific EB interactions with the tissues, we have chosen a concentration of EB insuring a low free EB concentration in equilibrium with EB:albumin complexes. The addition of such a low concentration of free EB, but in equilibrium with EB:albumin complexes, led to a continuous accumulation of EB in tubules.

The plateau of EB accumulation observed with the same concentration of free EB is converted into a continuous accumulation of EB.

Several lines of evidences indicate that this accumulation is not the consequence of a continuous EB binding, with transfer from albumin to tissue (see below), but results from the transport of EB:albumin complexes. A progressive accumulation of EB in endosomes and lysosomes leading to an increasing red fluorescence was indeed demonstrated by us (unpublished observation) as well as by Wilde et al [27] in cells or tubules exposed to EB:albumin complexes. If a 7:1 EB:Alb molar ratio is used, the process of EB accumulation is related to time (during 180 min) and tubular mass in our experimental conditions. The initial rate (0-15 min.) of EB accumulation is however always faster than the later rate (30-180 min.), indicating an initial binding phase of free EB to non specific sites and/or binding of EB:albumin complexes to specific receptors, a process which may occur faster than the whole cycle of protein reabsorption. The amplitude of EB accumulation with time is directly influenced by the concentration of EB:albumin complexes i.e. by albumin concentration. An apparent K_m for albumin transport close to 43 mg/mL is calculated. This value is comparable to that measured with ^{125}I -albumin in proximal tubules microperfused [23] or in opossum kidney cell lines [24]. The transport V_{max} observed in canine proximal tubules is 11.2 mg albumin / mg wet wt . hour.

The progressive accumulation of EB in tubular cells involves trapping of EB:albumin complexes in intracellular vesicles (fluid phase endocytosis) as well as endosomes formed following recognition of EB:albumin complexes by a membrane receptor (receptor-mediated endocytosis) [17, 26]. This latter event is the first step of the receptor-mediated endocytic process responsible for transport of albumin. Indeed, our experiments demonstrate that EB accumulation observed in presence of EB:albumin complexes is suppressed if the net charges present on the albumin molecule are changed i.e. if enough cationic charges are neutralized by the negative charges of EB (EB:Alb molar ratio above 14 [6]). This is a known feature of this system which reabsorbs cationic albumin faster and anionic albumin slower [22, 23]. We have modified the charges on albumin by increasing the amount of EB bound to the

molecule. It is known that EB binding involves mainly the lysine residues of the albumin molecule [1] and that up to 70 molecules are bound when albumin is saturated with EB [9]. The transport of albumin was progressively suppressed when EB:albumin complexes presenting more EB bound to albumin were used (35:1 to 70:1 molar ratio). The ratio that we chose for our experiments was therefore at or below this 7:1 EB:Alb molar ratio. A similar reduction of the rate of transport is observed when the cationic charges of albumin are reduced by another mechanism: albumin glycosylated on the lysine residues is poorly transported (not shown). This indicates that a recognition process sensitive to the charge topology, such as a receptor, is involved in albumin transport.

Another experiment indicating a binding of albumin to a receptor was performed. Identical final concentration of albumin insuring different mixtures of white and EB:albumin complexes were presented to the tubules. The rate of EB accumulation was followed and converted into albumin transport by taking into account the EB bound in the final albumin mixture. Reducing the amount of EB:albumin complexes reduced the EB accumulation, but this had only a minor effect on net albumin transport, indicating a competition of non-marked albumin with EB:albumin complexes for receptor binding sites.

The transport of FITC-albumin is known to be suppressed by increasing osmolarity [24], a maneuver which suppresses the formation of the clathrin-coated vesicles [11, 20] and which should not affect non-specific binding of EB. In our experiments, increasing osmolarity from 300 to 600 mOsm with sucrose (or NaCl) reduced considerably EB accumulation. However, a residual and slower process of accumulation was always observed at 600 mOsm, suggesting that a minor component of EB accumulation was insensitive to osmolarity, as already described [24]. The effect of osmolarity was largely reversible i.e. albumin transport increased toward normal upon removal of sucrose (not shown). A process clearly affected by osmolarity is unlikely to be attributable to non-specific EB binding.

EB accumulation during incubation of tubules with EB:albumin complexes is also sensitive to temperature. This process is largely suppressed at 22°C and at 4°C. It is known

that the endocytic cycle of albumin transport is acutely affected by temperature [22, 23, 26] while this should affect minimally non-specific EB binding. This observation in another argument in favor of a receptor-mediated albumine transport.

Finally, EB accumulation does not reflect non-specific binding to the cell membranes because this is an energy dependent process. Indeed, EB accumulation was suppressed by ATP depletion due to anoxia or to mitochondrial poisons such as KCN or 4-pentenoate [3]. However, the accumulation of EB:albumin complexes by canine tubules was not affected by an inhibitor of glycolysis, iodoacetate, in contrast to observation in the rabbit proximal tubules [22]. It must be remembered however that the latter species use largely glycolysis to support ATP production in proximal tubules, while canine tubules depend on mitochondrial production and oxidation of fatty acids [25]. This may explain different results with rabbit and dog proximal tubules. The transport of albumin was significantly affected by cytochalasin B. This indicated that an intact microtubular system is required for EB accumulation under our conditions as described elsewhere [22, 24, 26]. However, colchicine did not affect apparent albumine transport, suggesting that microfilaments are not involved in the endocytotic process.

We have postulated that the reduction of albuminuria observed in hyper- and normotensive diabetic patients following treatment with ACE inhibitors could be related to an increment in tubular protein reabsorption induced by these agents. All ACE inhibitors tested (enalaprilate, lysinopril, captopril) had no effect on proximal tubule albumin transport. It is concluded that the beneficial effect of ACE treatment on proteinuria is probably related to the effect of these agents on glomerular hemodynamics and not to a direct tubular effect on protein reabsorption.

We have noted in some experiments that an intense staining of the cells with EB, well above that measured in our experiments, was noted when extreme conditions were imposed i.e. when the cells died. The trypan or EB exclusion test is indeed widely used as a viability test for isolated cells. It must be concluded that sites of very high affinity for EB binding exist inside of the cells which are made accessible by a rupture of the cell membrane. The

study of albumin transport (EB:albumin complexes) by this technique must therefore involve conditions insuring cell viability.

The transport process of albumin can be also observed in electron microscopy by following the intracellular transit with anti-albumin specific antibodies visualized with gold beads [2, 14]. The technique demonstrates an early binding to BBM (presumably to receptors), the internalization of albumin:receptor complexes in endosomes and the release of albumin into endosomes from the membrane-bound receptor with time. These images and the progressive accumulation of EB probably reflect the same transport process.

With the experiments presented here, it is not possible to distinguish between luminal and basolateral transport of albumin. Indeed, both membranes are exposed to EB:albumin complexes. A small basolateral transport of albumin is known to occur in proximal tubules [4]. The proximal transport measured here is thus the sum of luminal and basolateral components. In order to evaluate the importance of this process, we have studied transport of EB:albumin complexes by distal tubules such as TAL and PCD deficient in BBM where the luminal transport is thought to be absent [4]. A significant transport was observed in these tubules in contrast to rabbit tubules [4].

Thus, the preparation of proximal tubules in suspension is an useful tool to examine functionally the process of protein transport as well as to isolate and study heavy "early" endosomes derived from receptor-mediated endocytosis pathway [18, 19]. This paper describes a method allowing to examine *in vitro* the transport of albumin by the proximal tubules in suspension. The luminal tubular transport is probably amplified by the absence of the accessibility barrier normally reducing the access of albumin to the BBM albumin receptors, i.e. by the absence of glomeruli. This technique has the advantage of being simple and close to the physiological situation. All the features of the albumin transport observed with the conventional, but laborious, macro- or micro-perfusion techniques [15, 16, 22] can be observed here. This tool can thus be exploited to evaluate albumin reabsorption *in vitro* during normal and pathologic states (diabetes, all the glomerular diseases, etc.).

Acknowledgments

This work was supported by a grant (MT-7875) of the Medical Research Council of Canada. The financial support of "Fondation de l'Hôpital Notre-Dame" is gratefully acknowledged. We acknowledge the invaluable contribution of Dr. M. Bendayan and Dr. I. Londoño for immunogold electron microscopy. The authors are grateful for the expert technical assistance of Mr. Jacques Sénécal and Mrs. Gisèle Grenier.

Bibliography

1. ALLEN TH, ORAHOVATS PD: Combination of toluidine dye isomers with plasma albumin. *Am J Physiol* 161:473-482, 1950
2. BENDAYAN M, GINGRAS D, CHAREST P: Distribution of endogenous albumin in the glomerular wall of streptozotocin-induced diabetic rats as revealed by high-resolution immunocytochemistry. *Diabetologia* 29:868-875, 1986
3. BOULANGER Y, WONG H, NOËL J, SÉNÉCAL J, FLESER A, GOUGOUX A, VINAY P: Heterogeneous metabolism and toxicity of 4-pentenoate along the dog nephron. *Renal Physiol Biochem* 16:182-202, 1993
4. BOURDEAU JE, CARONE FA: Contraluminal serum albumin uptake in isolated perfused renal tubules. *Am J Physiol* 224:399-404, 1973
5. CHINARD FP, LAUSON HD, EDER HA: Relationship of the renal clearances of T-1824 and of albumin in some patients with proteinuria. *J Clin Invest* 31:895-900, 1952
6. CHINARD FP, LAUSON HD, EDER HA: Evans blue (T-1824) and albumin clearances. *J Applied Physiol* 73:1695-1696, 1992
7. CLAUSEN DF, LIFSON N: Determination of evans blue dye in blood and tissues. *Proc Soc Exptl Biol Med* 91:11-14, 1956
8. CONNOLLY DC, WOOD EH: Simultaneous measurement of the appearance and disappearance of T-1824 (Evans Blue) in blood and tissue after intravenous injection in man. *J Applied Physiol* 7:73-83, 1954
9. FREEDMAN FB, JOHNSON JA: Equilibrium and kinetic properties of the Evans blue-albumin system. *Am J Physiol* 216:675-681, 1969
10. GREGERSEN MI, RAWSON RA: The disappearance of T-1824 and structurally related dyes from the blood stream. *Am J Physiol* 138:698-707, 1943

11. HEUSER JE, ANDERSON RG: Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J Cell Biol* 108:389-400, 1989
12. HUEPER WC, ICHNIOWSKI CT: Toxicopathologic studies on the dye T-1824. *Arch Surgery* 48:17-26, 1944
13. LEVEEN HH: Combination of evans blue with plasma protein: its significance in capillary permeability studies, blood dye disappearance curves, and its use as a protein tag. *Am J Physiol* 151:26-33, 1947
14. LONDOÑO I, GUITESCU L, BENDAYAN M: Glomerular handling of circulating glycated albumin in the normal mouse kidney. *Am J Physiol* 268:F913-F921, 1995
15. MAACK T: Renal clearance and isolated kidney perfusion techniques. *Kidney Int* 30:142-151, 1986
16. MAACK T, PARK CH: Endocytosis and lysosomal hydrolysis of proteins in proximal tubules. *Methods Enzymol* 191:340-354, 1990
17. MAACK T, PARK CH, CAMARGO MJF: Renal filtration, transport and metabolism of proteins, in *The Kidney: physiology and pathophysiology*, edited by SELDIN DW, GIEBISCH G, New York, Raven Press, 1985, pp. 1773-1816
18. MARSHANSKY V, FLESER A, NOËL J, BOURGOIN S, VINAY P: Isolation of heavy endosomes from proximal tubules in suspension. *J Membr Biol* 153:59-73, 1996
19. MARSHANSKY V, VINAY P: Proton gradient formation in early endosomes from proximal tubules. *Biochim Biophys Acta* 1284:171-180, 1996
20. OKA JA, WEIGEL PH: Effect of hyperosmolarity on ligand processing and receptor recycling in the hepatic galactosyl receptor system. *J Cell Biochem* 36:169-183, 1988
21. PARK CH: Time course and vectorial nature of albumin metabolism in isolated perfused rabbit PCT. *Am J Physiol* 255:F520-F528, 1988

22. PARK CH, CAMARGO MJF, MAACK T: Tubular handling of proteins. Absorption of albumin by isolated perfused proximal convoluted tubules of the rabbit, in *Proteinuria*, edited by AVRAM MM, New York-London, Plenum Medical Book Company, 1985, pp. 37-56
23. PARK CH, MAACK T: Albumin absorption and catabolism by isolated perfused proximal convoluted tubules of the rabbit. *J Clin Invest* 73:767-777, 1984
24. SCHWEGLER JS, HEPPELMANN B, MILDENBERGER S, SILBERNAGL S: Receptor-mediated endocytosis of albumin in cultured opossum kidney cells: a model for proximal tubular protein reabsorption. *Eur J Physiol* 418:383-392, 1991
25. TEJEDOR A, NOËL J, VINAY P, BOULANGER Y, GOUGOUX A: Characterization and metabolism of canine proximal tubules, thick ascending limbs and collecting ducts in suspension. *Can J Physiol Pharmacol* 66:997-1009, 1988
26. WALL DA, MAACK T: Endocytic uptake, transport and catabolism of proteins by epithelial cells. *Am J Physiol* 248:C12-C20, 1985
27. WILDE WS, LEGAN SJ, SOUTHWICK AK: Reabsorption of albumin-Evans blue via membrane vesicles of proximal kidney tubule cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 127:776-781, 1968

Figure captions

- Fig. 1.** *Binding of free Evans Blue to cortical tubules.* The concentration of EB was varied from 0.0125 to 12.5 mg/ml. The tubules were studied at time 0, 15, 30, 60, 120, 180 min. (1= EB (0.0125 mg/ml) (N=1); 2= EB (1.25 mg/ml) (N=7); 3= EB (1.56 mg/ml) (N=2); 4= EB (6.25 mg/ml) (N=2); 5= EB (12.5 mg/ml) (N=3)).
- Fig. 2.** *Binding or transport of Evans Blue in cortical tubules incubated in absence or in presence of 0.0125 mg/ml free EB or in presence of EB:albumin complexes insuring 0.02 mg/ml free EB and 1.2 mg/ml EB bound to albumin.* The tubules were studied at time 0, 15, 30, 60, 120, 180 min. (1= EB (0.0125 mg/ml) (N=2); 2= EB (1.25 mg/ml bound to Alb (12.5 mg/ml) (N=49)).
- Fig. 3.** *Transport of Evans Blue:albumin complexes as a function of tubular mass.* The concentration of albumin was 12.5 mg/ml with a 7:1 EB:alb molar ratio. Tubular mass was varied from 2 to 20 mg/ml. The tubules were studied at time 60 min by increasing the volume of the tubular suspension (82 mg/ml) in a fix volume of incubation medium.
- Fig. 4.** *Transport of Evans Blue:albumin complexes in cortical tubules incubated in presence of 6.25, 12.5 and 25 mg/ml albumin with a 7:1 EB:Alb molar ratio.* The tubules were studied at time 0, 15, 30, 60, 120, 180 min. (1=Alb (6.25 mg/ml); 2= Alb (12.5 mg/ml); 3=Alb (25 mg/ml)).
- Fig. 5.** *Transport of Evans Blue:albumin complexes in cortical tubules as a function of albumin concentration.* The tubules were studied at time 60 min with a 7:1 EB:alb molar ratio (N=12).

- Fig. 6.** *Transport of Evans Blue:albumin complexes and free EB in cortical tubules incubated in presence of white and blue albumin (with a 7:1 EB:alb molar ratio). The final albumin concentration was held at 12.5 mg/ml. The tubules were studied at time 60 min. (1=EB; 2=Alb).*
- Fig. 7.** *Transport of Evans Blue:albumin complexes in cortical tubules incubated with 12.5 mg/ml albumin having: 1= 7:1 (N=50), 2= 35:1 (N=6) and 3= 70:1 (N=6) EB:Alb molar ratio. The tubules were studied at time 0, 15, 30, 60, 120, 180 min.*
- Fig. 8.** *Transport of Evans Blue:albumin complexes in cortical tubules as a function of osmolarity (with a 7:1 EB:alb molar ratio). The osmolarity was varied with addition of sucrose 300 mOsm. The tubules were studied at time 0, 15, 30, 60, 120, 180 min. (1= 300 mOsm (N=50); 2= 600 mOsm (N=13)).*
- Fig. 9.** *Transport of Evans Blue:albumin complexes in cortical tubules as a function of temperature (37, 22 and 4 °C (with a 7:1 EB:alb molar ratio). The tubules were studied at time 0, 15, 30, 60, 120, 180 min. (1= 37°C (N=19); 2= 20°C (N=1); 3= 4°C (N=1)).*
- Fig. 10.** *Immunogold electron-microscopic visualization of albumin uptake by receptor-mediated endocytosis in dog proximal tubules in suspension. The tubules were in contact with albumin for 0 min (A), 30 min (B) or 60 min (C) before the fixation procedure. The antigen-antibody complexes were revealed by using protein A linked to gold particules.*
- Fig. 11.** *Transport of Evans Blue:albumin complexes in cortical tubules, thick ascending limbs and papillary collecting ducts (with a 7:1 EB:alb molar ratio). The tubules were studied at time 0, 15, 30, 60, 120, 180 min. (1= proximal tubules (N=49); 2= TAL (N=5); 3= PCD (N=3)).*

Figure 1.

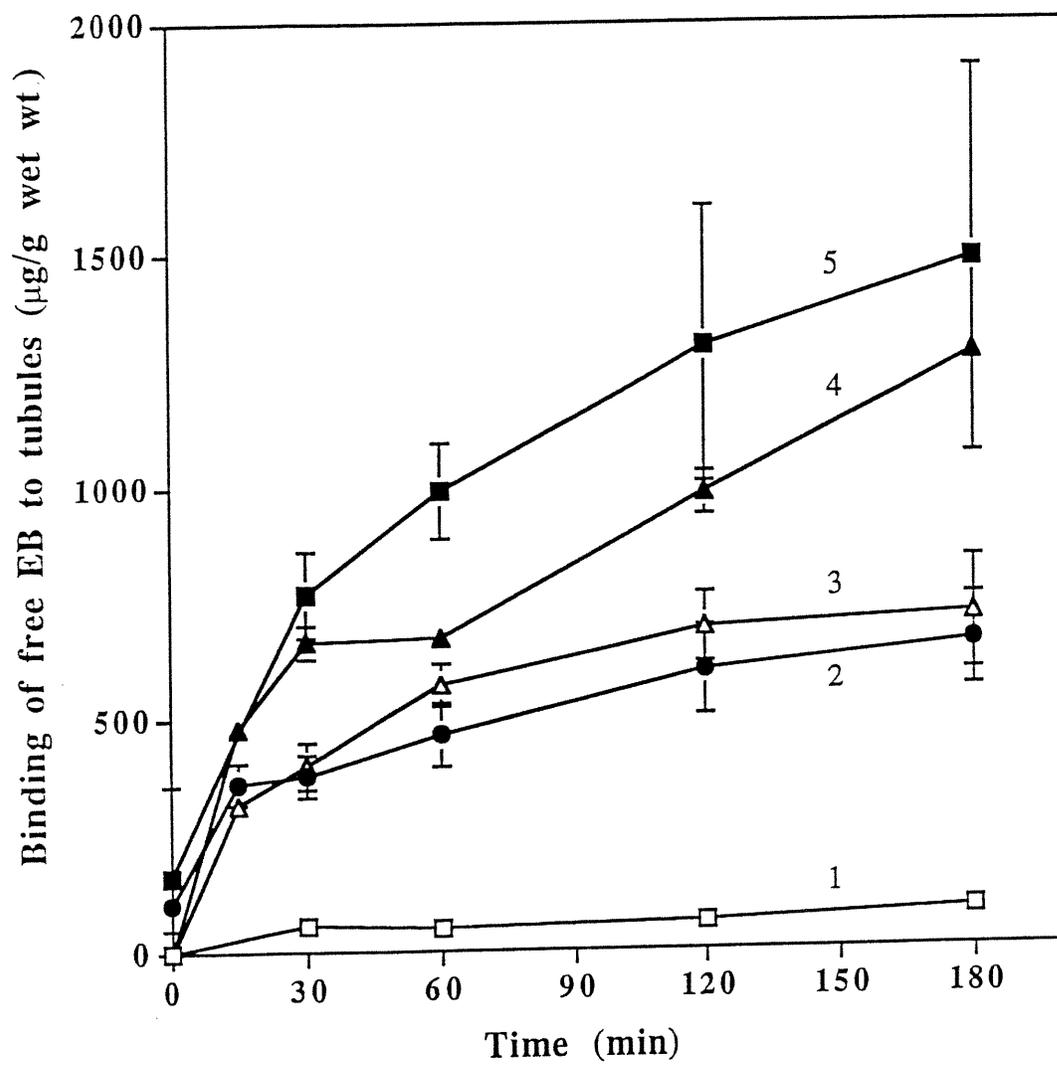


Figure 2.

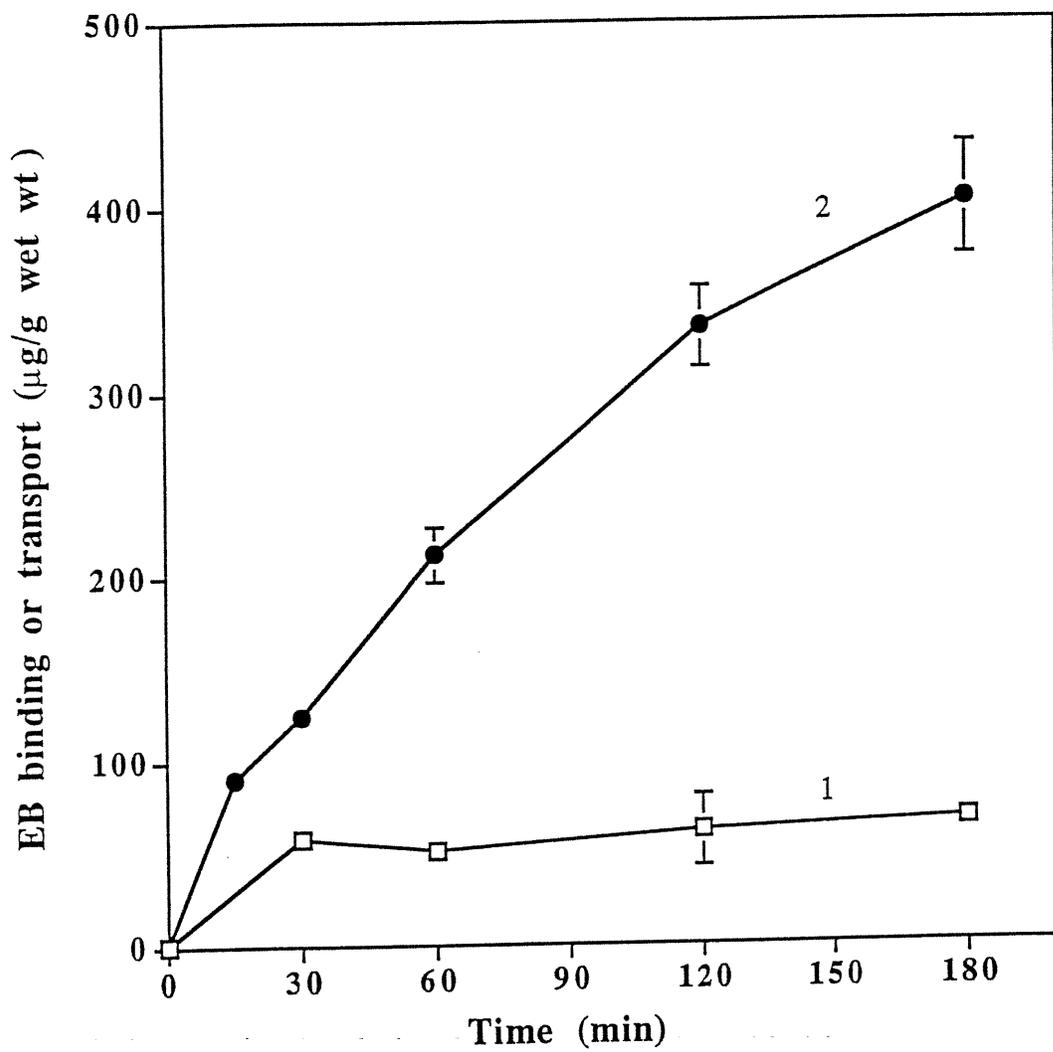


Figure 3.

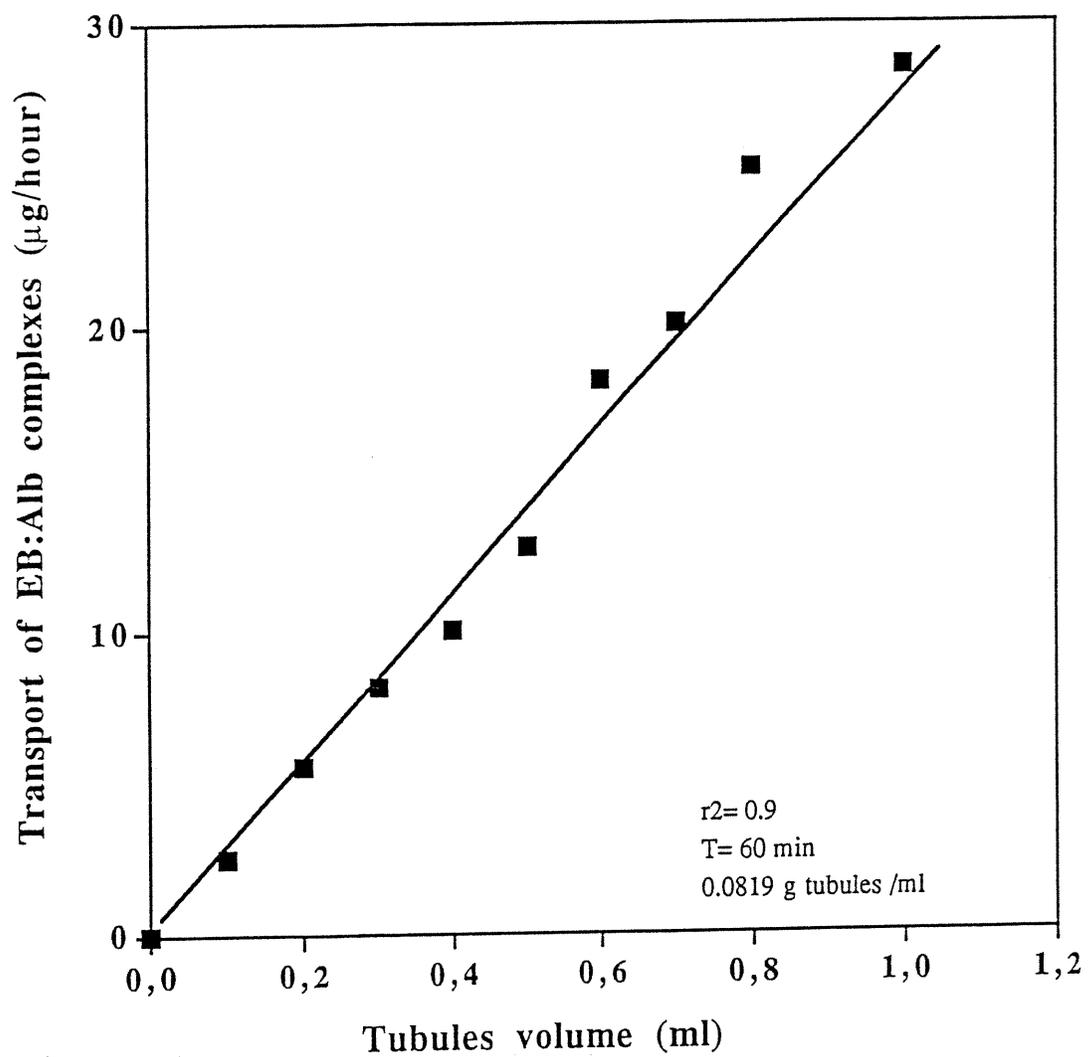


Figure 4.

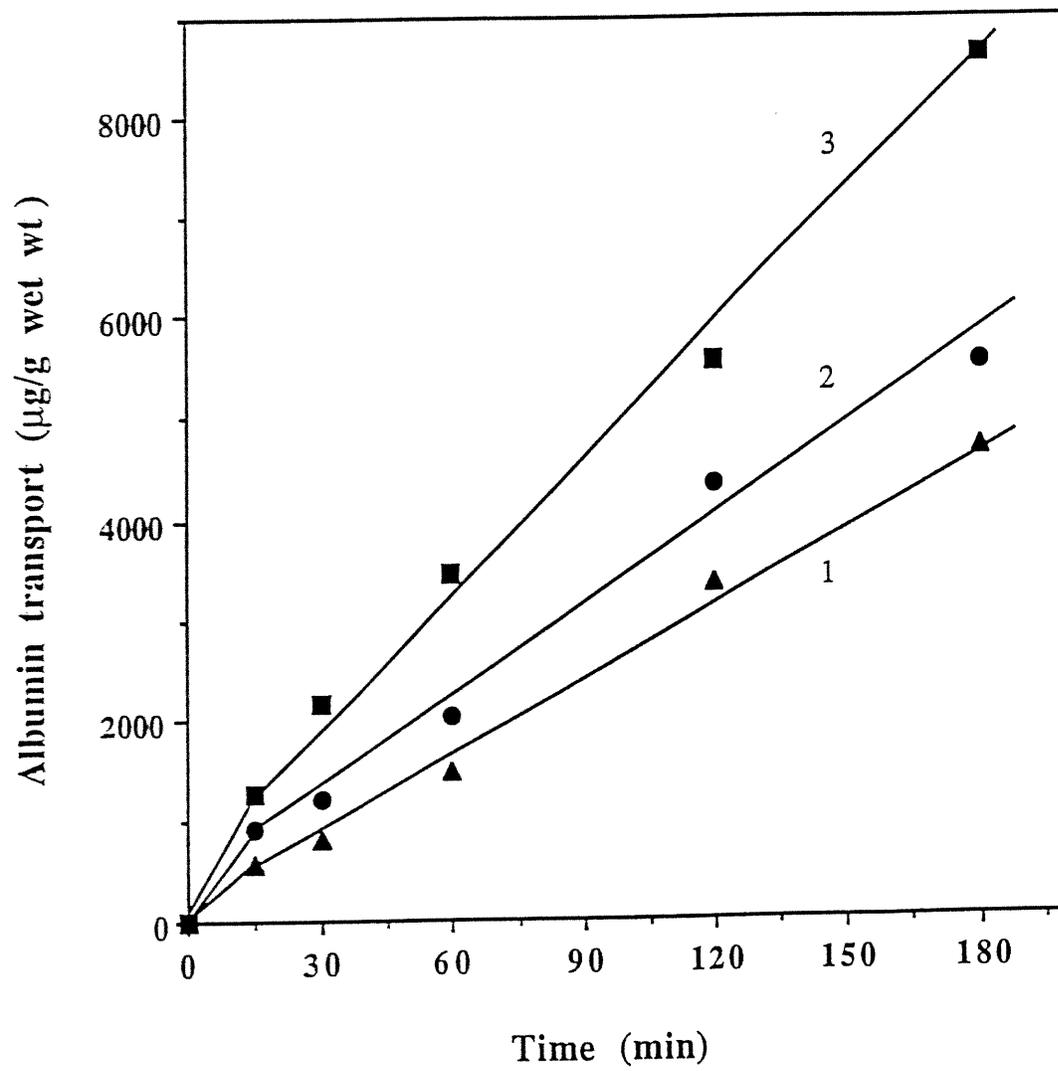


Figure 5.

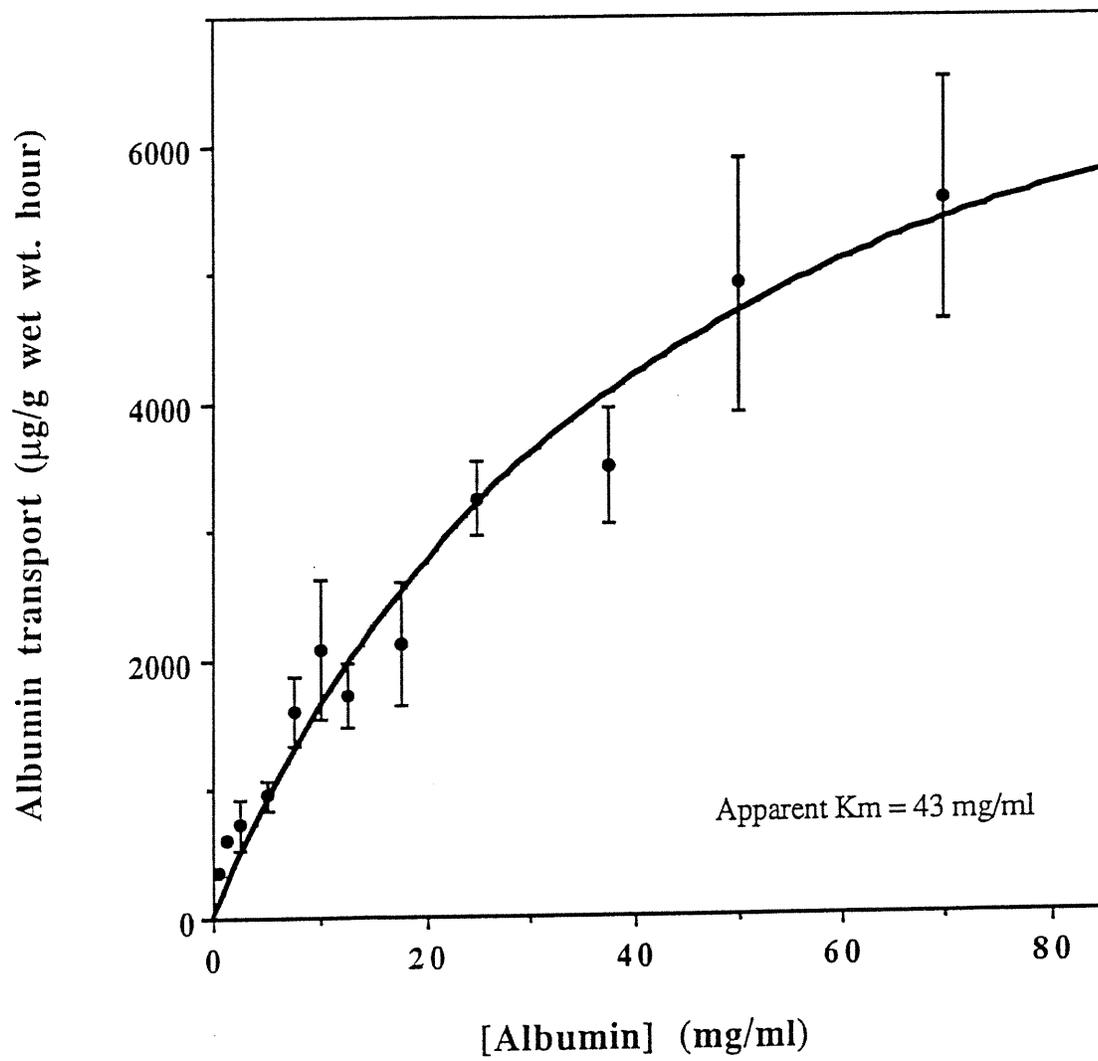


Figure 6.

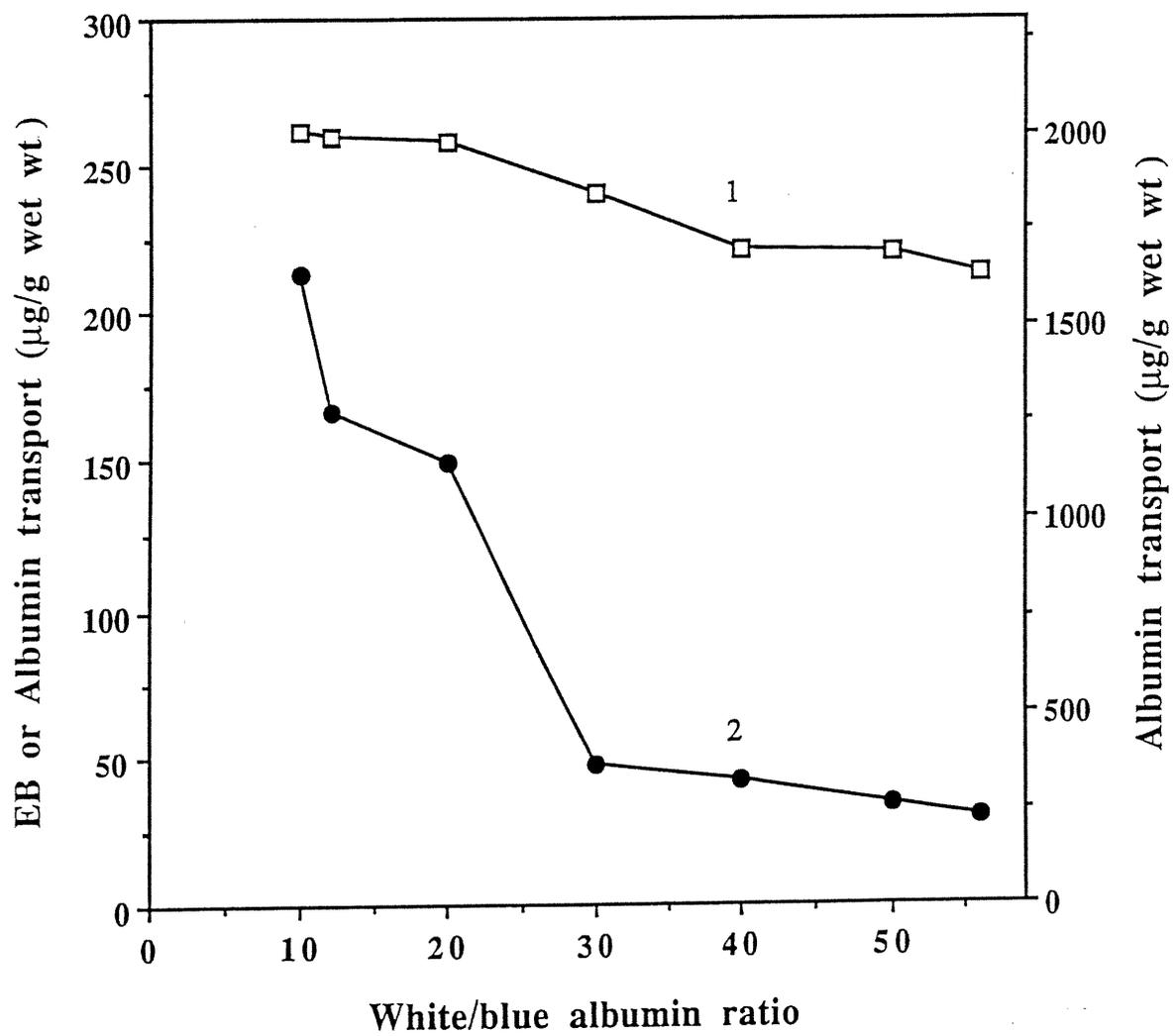


Figure 7.

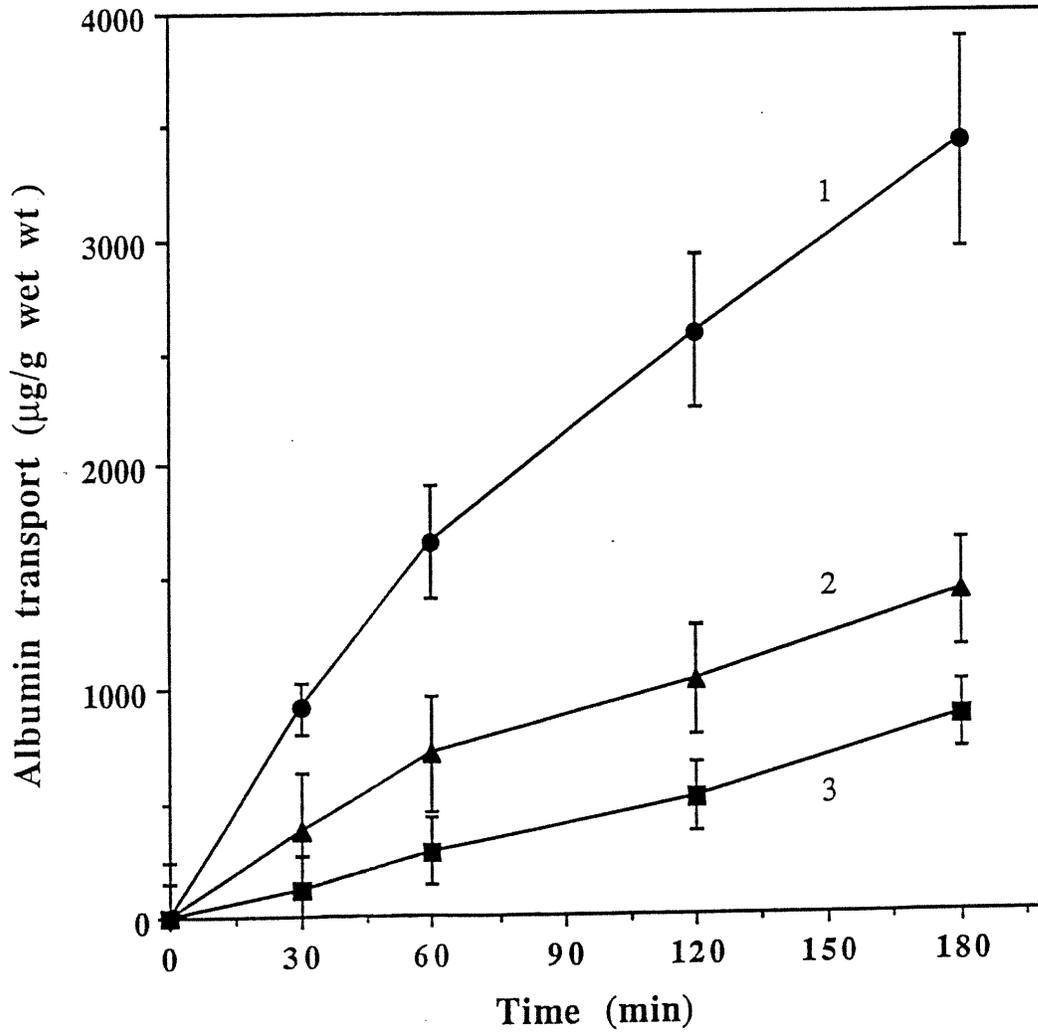


Figure 8.

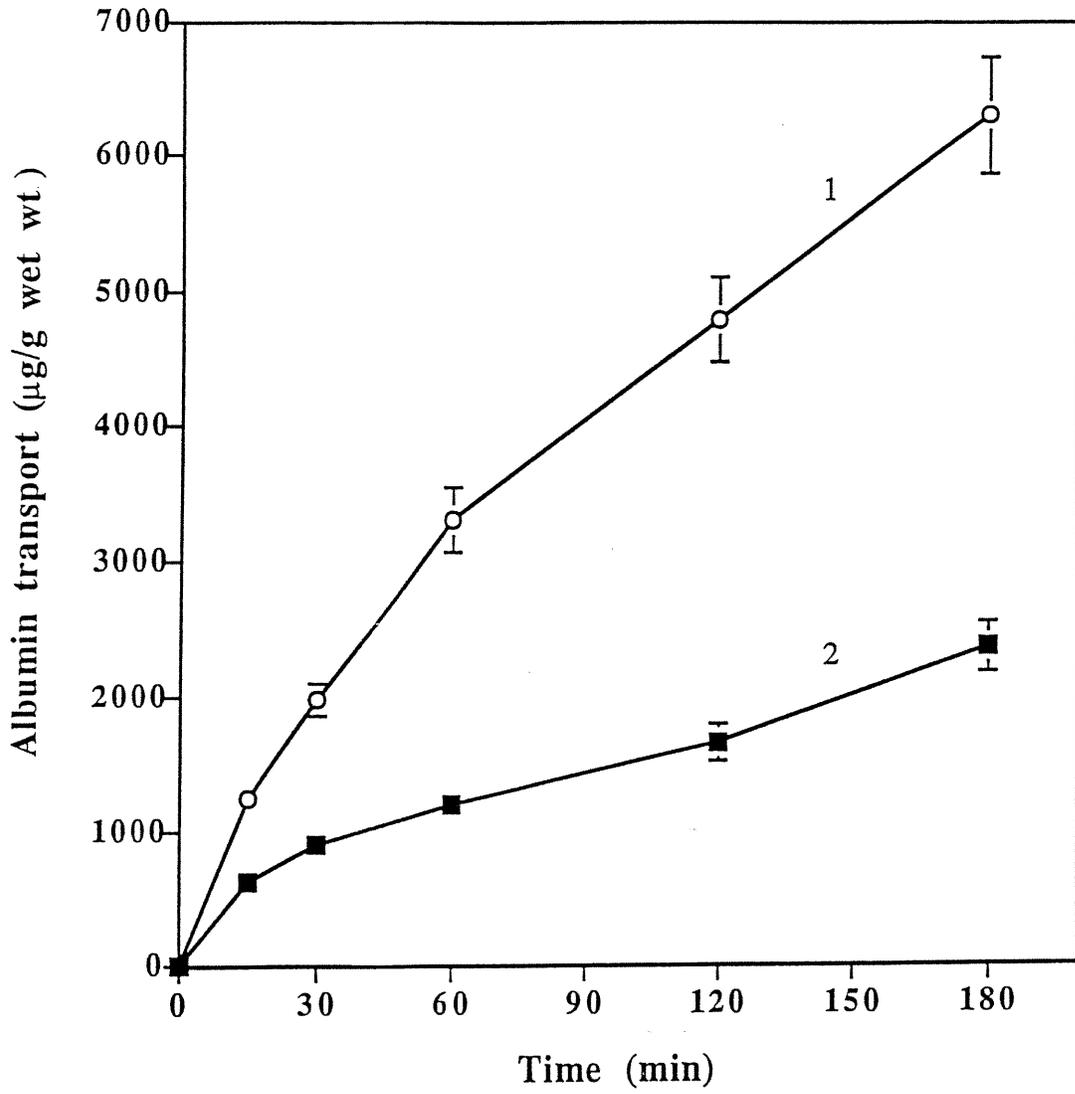


Figure 9.

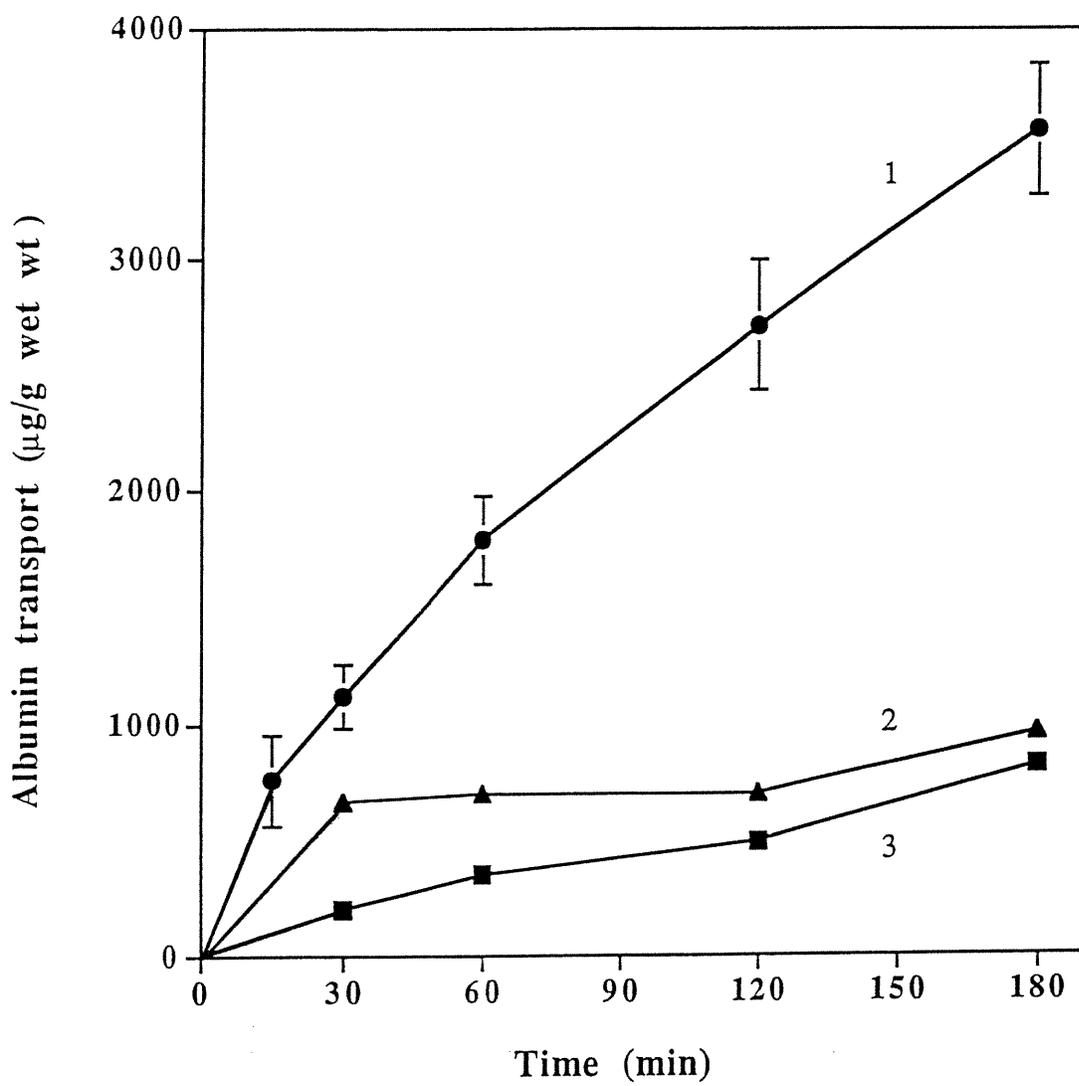


Figure 10.

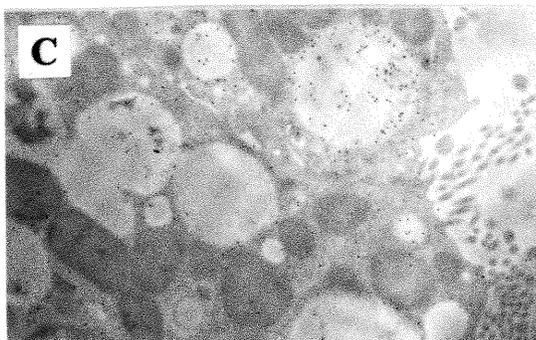
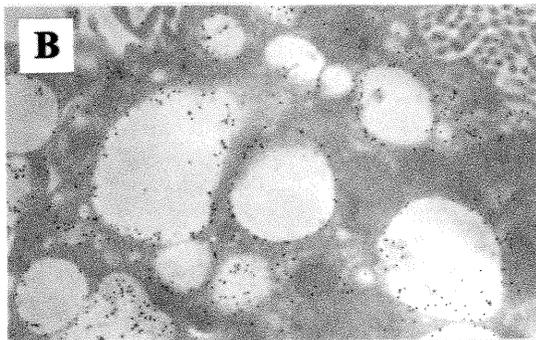


Figure 11.

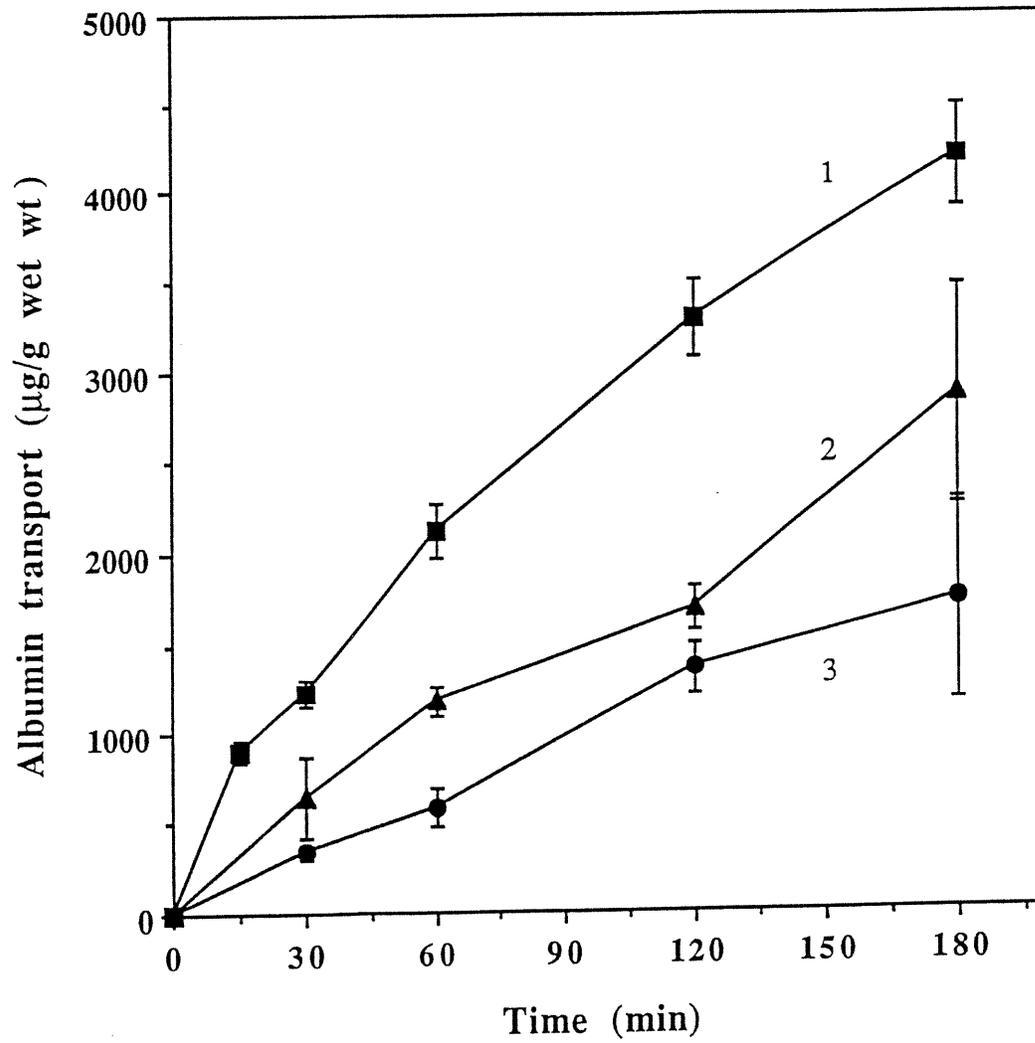


Table 1. Effect of different substances and anoxia treatment on the transport of EB:Alb complexes by proximal tubules

Effectors	Concentrations (mM)	N	% of control
Nil		63	100
Creatinine	0.5-10	13	115 ± 2
KCN	0.25	2	47 ± 8
4-Pentenoate	1	4	44 ± 10
Iodoacetate	0.5 -10	12	128 ± 13
Cytochalasin B	0.1	8	42 ± 22
Colchicine	2	7	89 ± 19
Captopril	0.25-10	8	99 ± 5
Enalaprilate	0.5-2	2	110 ± 5
Lysinopril	0.25-10	8	101 ± 5
Angiotensin II	0.0001-0.02	3	127 ± 12
Ionomycin	0.002-0.02	4	113 ± 6
Anoxia 30 min		2	0

The effect of these substances and anoxia was studied in time course experiments (0-180 min).

Regulation of renal albumin endocytic reabsorption by endosomal proton transport

M.O. Richard, J. Bartle, J.L. Houde, V. Marshansky and P. Vinay

Laboratoire de Néphrologie, Centre de Recherche Louis-Charles Simard
Hôpital Notre-Dame, Montréal, Québec, H2L 4M1,
Canada.

Telephone: (514) 876-6892

FAX: (514) 876-5315

Short title: Albumin transport in proximal tubules.

Key words: albumin, endocytosis, Evans blue, proximal tubules, V-type
H⁺-ATPase, Cl⁻-channel, Na⁺/H⁺- exchanger.

Summary

Albumin is reabsorbed by the proximal tubule mostly via a receptor-mediated endocytic process. We have evaluated tubular albumin transport *in vitro* by following the cellular accumulation of Evans Blue (EB) bound to albumin (7:1 EB:Alb molar ratio) in suspensions of canine tubular segments of proximal origin. Tissue-bound EB was measured photometrically after extensive washing and solubilization of the suspension of proximal tubules. In presence of 12.5 mg/mL EB:albumin complexes, EB accumulates in proximal tubules with time, a process which was markedly reduced by hyperosmolarity (300-600 mOsm). Albumin transport was also inhibited by maneuvers suppressing endosomal acidification (inhibition of V type H⁺-ATPase, inhibition of chloride transport, quenching of endosomal pH gradient). The estimation of ATP turnover made from oxygen consumption measurements demonstrated that some of these maneuvers inhibited (bafilomycin) or stimulated (NH₄Cl) the proton pumps. These effectors had no effect on the initial binding of EB or EB:albumin complexes to the luminal membrane but significantly decreased albumin transport into the tubules. In contrast, amiloride, which inhibits the membrane Na⁺/H⁺- exchanger, greatly enhanced the initial binding of EB:albumin complexes but not the rate of albumin transport. These observations suggest that the luminal H⁺ extrusion by Na⁺/H⁺- exchanger exceeds that due to the H⁺-pumps despite the low activity of the former in the carnivorous species. It is concluded that luminal and endosomal acidification mechanisms may affect differently albumin transport by suspensions of kidney tubules.

Introduction

Proximal tubular cells are known to reabsorb filtered proteins including albumin [12, 17]. We have developed a simple technique to evaluate protein transport by a suspension of proximal tubules *in vitro* [19]. This technique measures the progressive accumulation of EB occurring in tubules following internalization of EB:albumin complexes with secondary accumulation of Evans Blue in the lysosomes of the cells.

In this paper, we demonstrate that endosomal acidification is required for protein transport in intact tubules. Inhibition of ATP-dependent endosomal acidification, of chloride channel activity or dissipation of endosomal pH gradient suppresses similarly this transport. We also demonstrate that inhibition on the Na^+/H^+ -exchange only affects the binding of albumin to the luminal receptors *in situ* but not the rate of transport.

Methods

Reagents

Evans Blue, sucrose, amiloride, ouabain, oligomycin, lactate, pyruvate were obtained from Sigma Chemicals Co. (St Louis, MO, USA). Collagenase A was provided by Boehringer-Mannheim (GmbH, W.-Germany). Albumin was obtained from ICN Biomedicals Inc. (Costa Mesa, CA, USA); NH₄Cl was from Fisher Scientific (Nepean, ON, Canada) while DIDS, SITS and DNDS were from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Bafilomycin was provided by Wako Bio Products (Richmond, VA, USA). NPPB was obtained from Research Biochemicals International (Natick, MA, USA).

Preparation of tubule suspensions from dog kidney

Cortical tubules (CT) were prepared by collagenase digestion of dog kidney cortex as previously described [20]. All animals were cared for in accordance with the principles and guidelines of the Canadian Council of Animal Care. The suspension of cortical tubules obtained was used as such without further purification, and consisted mainly of proximal tubules (> 85 %). The tubules (around 80 mg wet wt /mL) were suspended in ice-cold Krebs-Henseleit saline (KHS) freshly gassed with 5% CO₂:95% O₂.

Preparation of Evans Blue-albumin complexes

Fatty-acid free bovine albumin (fraction V, ICN Biomedicals Inc.) was dissolved in KHS (125 mg/mL). Evans Blue (EB) was added in albumin (Alb) aliquots to obtain a 7:1 EB:Alb molar ratio [19].

Measurement of albumin transport by proximal tubules in suspension

Proximal tubules (around 80 mg wet wt) were incubated for 0, 15, 30, 60, 120, 180 min. in a final volume of 4 mL in gassed KHS in presence of metabolic substrates (10 mM lactate and 0.1 mM pyruvate) at 37°C. The final concentration of albumin in the flasks was 12.5 mg/mL (white albumin or EB:albumin complexes). When required, effectors were included in the incubation medium: sucrose, bafilomycin, NH₄Cl, DIDS (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2' disulfonic acid), SITS (4-acetamido-4'-isothiocyanatostilbene-2,2' disulfonic acid), DNDS (4,4'- dinitro-stilbene-2,2' disulfonic acid), NPPB (5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoic acid).

After the incubation, the flasks were emptied in tubes and washed with 3 ml 1% white albumin (in KHS) to wash out the residual tubules. The washings were added to the flask content which were then centrifuged at slow speed (1.000 rpm) for 30 sec on order to spin down the tubules. The supernatant was removed by aspiration and the tubular pellet was resuspended with 3 mL 1% white albumin. This procedure was repeated three times. The tubules were then resuspended in 1 mL 1% albumin and centrifuged in an Eppendorf microcentrifuge for 4 min. at 8.000 rpm. The supernatant was discarded and the tubules were finally resuspended in 1 mL 1% SDS (sodium dodecyl sulfate), thoroughly mixed and left overnight to solubilize the proximal tubules. The solubilizate was added to tubes containing 1 mL 1 M NaOH, 1 mL ethanol and 0.95 mL H₂O to obtain a final volume of 4 mL.

Following mixing, the optical density of the diluate was measured at 595 nm (specific absorption of EB) and 800 nm (to measure the light absorption and/or scattering due to turbidity). Flasks containing tubules incubated without EB were included in each experiment in order to calculate the absorbance due to turbidity at 595 nm as predicted from measurements at 800 nm. The correction applied to the optical density of each tube at 595 nm was minor and usually below 5% of the EB signal. The specific absorbance was then calculated and converted in terms of micrograms of EB using a calibration curve. The

EB transported by the tubules was calculated by subtracting the binding component estimated from the value measured at time zero from that found after 15-180 min. incubation. The transport is expressed as mg EB accumulation/g tubular proteins. The amount of albumin transported is then calculated from the EB:Alb ratio.

Measurement of respiration of proximal tubules

Tubular respiration was measured using an oxygen electrode-based oxymeter [20]. The activity of the Na⁺-pumps *in situ* was estimated as the fraction of tubular respiration suppressed by 1 mM ouabain and that of the H⁺-pumps as that suppressed by 1 μM bafilomycin [15]. The phosphorylative respiration was taken as the respiration sensitive to 2.5×10^{-7} M oligomycin B, a specific inhibitor of the mitochondrial ATP synthetase. The non-phosphorylating respiration was taken as the oligomycin-insensitive respiration.

Determination of protein content

Proteins were assayed using the BCA Protein Assay Reagent (Pierce Chemical Company) using albumin as standard.

Statistics

Statistical analyses were done using Stat-View 512+™ and SuperAnova™ (Abacus Concepts, Inc.).

Results

Measurement of albumin transport

Transport of albumin was estimated from the accumulation of EB in cortical tubules exposed to EB:albumin complexes using a 7:1 EB:Alb molar ratio as previously described [19]. The accumulation of EB in the cells was measured following solubilization of the tissue and therefore reflects both EB binding to the cell membrane and accumulation of EB in endosomes and lysosomes occurring following albumin transport. The latter component was demonstrated to explain most of the EB accumulation [19], thus allowing an estimation of the rate of albumin transport. Figure 1 (Curve 1) demonstrates that the initial (0-15 min.) total EB accumulation proceeds somewhat faster than the near-linear process observed at later times (15-180 min). The slopes of EB accumulation as a function of time measured for 0-15 min ($770 \mu\text{g}$ of albumin transported / min . g tubular protein) and 15-180 min. ($240 \mu\text{g}$ of albumin transported / min . g tubular protein) were used to describe these two components of EB accumulation and to compare the effect of various effectors on these processes (Table 1).

Effect of osmolarity on albumin transport

If the osmolarity of the incubation medium is increased from 300 to 650 mOsm with addition of sucrose, the progressive (15-180 min.) accumulation of EB is largely reduced ($100 \mu\text{g}$ albumin / min . g tissue protein) ($p < 0.01$) (Figure 1 and Table 1). If the osmolarity is progressively increased (Figure 2), a significant ($p < 0.05$) reduction of albumin transport being observed with a 100 mOsm increment of osmolarity (Figure 2).

Effect of bafilomycin on albumin transport

If bafilomycin, a specific inhibitor of the vacuolar proton pump, is added in the milieu at concentration (10^{-6} M) capable of inhibiting the activity of the pumps present both on the BBM and on endocytic vesicles [15] (referred to as endosomes in this paper), the initial binding (0-15 min.) of EB is not changed but the constant accumulation (15-180 min.) of EB is reduced ($p < 0.01$) (from 240 to 90 μg albumin / g protein . min.) (Figure 3, Curve 4 and Table 1). The rate of initial EB binding (1-15 min.) remains faster to that observed with sucrose. However, the active continuous endocytic process (15-180 min.) is comparable to that observed with sucrose (Figure 3, Curve 6 and Table 1). If bafilomycin is increased from 1 to 3 and 6 μM , no additional effect is observed: the full effect is already obtained at 1 μM . Thus, the sucrose-inhibitable EB:albumin transport is also a bafilomycin-sensitive transport.

Effect of amiloride on albumin transport

The application of amiloride stimulated markedly the initial binding of EB:albumin complexes to tubules ($p < 0.01$) but had no effect on the later process of EB accumulation indicating albumin transport (300 μg albumin / g protein . min) (Figure 3, Curve 1 and Table 1).

Effect of NH_4Cl on albumin transport

NH_4Cl , an agent interfering with the formation of proton gradients across endosomal membranes, was also capable of inhibiting albumin transport without changing the initial kinetics of binding as assessed after 15 min. (Figure 3, Curve 5 and Table 1). The EB accumulation curve observed with NH_4Cl was identical to that observed with bafilomycin.

Effect of chloride channels inhibitors on albumin transport

Inhibitor of chloride channels such as DIDS inhibited the constant transport of albumin but had no effect on the initial binding of EB:albumin complexes (Figure 4, Curve 1 and Table 1). The inhibition of albumin transport by DIDS (Figure 4, Curve 1) was comparable to that produced by bafilomycin (Figure 3, Curve 4) or by NH_4Cl (Figure 3, Curve 5). However, SITS, DNDS or NPPB which are probably less permeant to the cell interior had no effect on albumin transport.

ATP turnover

The respiration of tubules was measured after a preincubation for 60 min. at 37 C° in order to study tubules under a steady-state situation (Table 2). The effect of various effectors was used to sequentially quantify the ATP synthesis supporting Na^+/K^+ -ATPase (ouabain-sensitive respiration), ATP synthesis supporting V-type H^+ -ATPase (bafilomycin-sensitive respiration), total ATP synthesis (oligomycin-sensitive respiration) as well as the non-phosphorylating component of the total respiration (oligomycin-insensitive respiration). The effect of sucrose, NH_4Cl , DIDS and $\text{DIDS}+\text{NH}_4\text{Cl}$ on these components of respiration was examined.

Table 2 shows that the phosphorylating respiration (ATP turnover), taken as the oligomycin-sensitive respiration, represents 75-80% of the total respiration. Under control condition, the activity of the sodium pumps requires 45.6% and the proton pumps 28.4% of the total ATP turnover. All other ATPases require together 24.4 % of the ATP turnover.

The addition of sucrose, which abolished the active internalization of EB:albumin complexes, had no significant effect on any of these components of respiration indicating that sucrose does not interfere with albumin transport by inhibiting an ATP-dependent process.

The addition of NH_4Cl reduced significantly the ouabain-sensitive respiration ($-38 \mu\text{mol/g wet wt} \cdot \text{hour}$) (Table 2). In contrast, NH_4Cl increased significantly the bafilomycin-sensitive respiration ($+27 \mu\text{mol/g wet wt} \cdot \text{hour}$) (Table 2). NH_4Cl therefore increased the oligomycin-sensitive respiration ($+25 \mu\text{mol/g wet wt} \cdot \text{hour}$) i.e. activated some ATPases distinct from the sodium or the proton pumps. The overall phosphorylating respiration was not significantly changed however indicating that the inhibition of the sodium pumps (-38) and the stimulation of the activity of proton pumps and of other ATPases ($+52$) were of comparable magnitude.

DIDS, an inhibitor of chloride channels, reduced the apparent activity of the sodium pumps (-23) and of other ATPases (-22) but had no effect on the apparent activity of the proton pumps. In presence of $\text{NH}_4\text{Cl}+\text{DIDS}$, the effect observed was largely that of NH_4Cl alone. None of the effectors had a significant effect on the non-phosphorylating respiration.

Discussion

Transport of albumin by proximal tubules involves several steps [2, 12, 17, 18, 22]. The process starts by the binding of albumin to receptors located on the external membrane leaflet of clathrin-coated areas of the BBM [11, 22]. This receptor (gp330) recognizes proteins with a poor specificity [1]. The topology of charges on the albumin molecule and of its membrane receptor is however important for this liaison since cationic albumin is transported faster than anionic albumin [17, 18]. The membrane area containing albumin:receptor complexes then enters a vesiculization process [8]. Albumin bound to the membrane receptors is now located inside clathrin-coated vesicles (receptor-mediated endocytosis) [7, 8]. These vesicles then lose their clathrin coat due to specific ATP-dependent uncoating enzymes [3, 4, 10, 16]. The activation of the proton pumps then simultaneously acidifies the endosomal interior [7], reducing the affinity of the protein receptor for albumin and liberating it as a free protein in the endosomal space. Recently [14], the early endosomes were purified to homogeneity from dog kidney proximal tubules in suspension. Flow cytometry analysis and Western blotting experiments demonstrated that these endosomes are loaded with FITC-albumin indicating high homogeneity and their origin from receptor-mediated endocytosis pathway. A complete analysis of acidification machinery which contains at least three proteins (V-type H^+ -ATPase, Cl^- -channel and Na^+/H^+ -exchanger) in these endosomes was also realized [13]. Acidification allows the fusion of endosomes with lysosomes [22] and the transfer of albumin in this compartment. The local degradation of albumin by acid hydrolases (and accumulation of EB) follows this process [2, 11, 22]. The endocytic vesicles are recycled to the BBM [22] to allow the protein reabsorption cycle to continue. This mechanism implies that the overall protein transport should be markedly influenced by the local pH at the BBM (binding of albumin to receptor) as well as endosomal pH (dissociation of the albumin:receptor complexes). Vesicles containing free albumin are also formed through fluid-phase endocytosis. Acidification may not be required for this process [9].

When EB:albumin complexes insuring a 7:1 EB:Alb molar ratio is presented to the tubules, they are delivered to the lysosomes during the endocytic cycle. Albumin is then degraded locally and tissue accumulation of EB becomes a marker of albumin transport [21].

We have described that EB accumulation in proximal cells follows a two phase kinetics [19]. The initial phase (0-15 min.) is largely due to binding of free EB to the cell membrane and to the binding of EB:albumin complexes to albumin receptors on this membrane. This initial phase should be influenced by the density of receptors on the membrane [9] i.e. by the recycling of receptors. It is followed by a slower more linear (15-180 min.) process of EB accumulation indicating the internalization of EB:albumin complexes by the endocytic cycle [19]. This latter process can be suppressed by increasing osmolarity [10, 16]. In presence of sucrose increasing the osmolarity from 300 to 650 mOsm, the rate of EB accumulation is progressively reduced. The fraction of the endocytic transport affected by sucrose was taken as reflecting active albumin transport through receptor-mediated endocytic processes. Sucrose had no significant effect on the activity of the sodium or proton pumps: hyperosmolarity interferes with protein transport through specific mechanisms related to the traffic of clathrin-coated vesicles [10, 16]. However, as observed by others [10, 16], sucrose was unable to suppress albumin transport completely. Since the effects of bafilomycin and NH_4Cl duplicate the effect of sucrose, and since these treatments only affect the receptor-mediated endocytic process [9], it can be postulated that fluid-phase endocytosis remains unaffected by these treatments and by sucrose.

Our observation indicates that osmolarity changes observed in diabetic patients (+5 to +25 mOsm) may modulate protein (albumin) reabsorption by proximal tubules, i.e. may change the magnitude of the proteinuria. Hyperglycemia *per se* could then increase the tubular rejection of protein without changing the rate of protein filtration.

In this paper, we have examined the influence of the activity of the vacuolar proton pumps on tubular protein transport. It should be remembered that these proton

pumps are located both on the BBM [15] (activity not limited by the establishment of a pH gradient) and on endosomes (activity limited by the establishment of a pH gradient) and that pumps located on both locations contribute to the total H⁺-ATPase activity in isolated proximal tubules [6, 15].

Inhibiting the activity of proton pumps with bafilomycin had no effect on the initial binding of free EB and EB:albumin complexes. Bafilomycin however suppressed all the respiration attributed to the activity of proton pumps as observed elsewhere [15] and simultaneously reduced severely albumin transport. The acidification of endosomes is indeed required for the dissociation of the receptor:ligand complexes and for the fusion of endosomes with lysosomes [2]. Inhibiting the proton pumps and therefore endosomal acidification interfered with this process and reduced albumin transport. However, bafilomycin did not abolish completely the transport, the EB accumulation observed with bafilomycin remaining comparable to that observed in presence of sucrose. This suggests that a bafilomycin- and sucrose-insensitive mechanism also contributed to protein transport (see below). It is possible that a pH-independent fluid-phase endocytosis occurring at the luminal or basolateral membrane may be at play here [9].

Next, we examined the effect of NH₄Cl on albumin transport. NH₄Cl, by generating gaseous NH₃ which diffuses continuously into endosomes, interferes with the endosomal accumulation of protons [9]. NH₄Cl abolished active EB accumulation in a manner indistinguishable to that of bafilomycin. Again, NH₄Cl had no effect on the binding kinetics estimated after 15 min. This result confirms the interpretation presented above: abolition of endosomal acidification suppresses a large component of protein transport. In contrast with bafilomycin, the proton pumps were not inhibited but stimulated by the clamping of the membrane pH gradient by NH₄Cl since the bafilomycin-sensitive respiration increased. Indeed, when the proton pumps accumulate protons in the endosomal space, a pH gradient is created which is capable of limiting the activity of proton pumps and this limitation is reduced in presence of NH₄Cl.

The permeability of endosomes to chloride normally limits the building of a membrane potential following protons accumulation and therefore favors endosomal acidification. It can be expected therefore that inhibition of endosomal chloride channels may increase the membrane potential and reduce endosomal acidification and secondarily albumin transport. Indeed, DIDS, a non-specific but cell-permeant blocker of chloride channels, reduced EB accumulation to the same extent than bafilomycin or NH_4Cl . In accord, DIDS also effectively reduces acidification in purified endosomes *in vitro* [13].

Other blockers of various chloride channels such as DNDS, NPPB and SITS, are active on endosomal preparations [13], but had no effect on EB accumulation in intact cells. We believe that cellular permeability limits the intracellular access of these chloride channels blockers. The respiration related to the activity of the proton pumps was not affected by DIDS suggesting that the diffusion of DIDS itself into the endosomal compartment led to the quenching of the proton gradient i.e. maintained the activity of the proton pumps. DIDS would act as NH_4Cl as a proton acceptor capable of maintaining or stimulating the activity of pumps without allowing a net acidification of endosomes to occur. In accord with these interpretations, combining DIDS and NH_4Cl had the effect of NH_4Cl alone.

We then studied the effect of inhibition of another proton extruding mechanism present on both the BBM and on endosomes [6, 13], the Na^+/H^+ -exchanger. Amiloride stimulated markedly the initial binding of EB:albumin complexes, an effect not seen with bafilomycin. Even if a scarce population of Na^+/H^+ -exchangers is present on the BBM of the dog [5], this activity probably acidifies significantly the microenvironment of the external leaflet of the BBM including the regions of coated-pits. Since the affinity of albumin for its receptor is influenced by pH [7, 22] (decreased by acidification as seen during the endosomal cycle), it may be expected that an alkalization of the extracellular microenvironment of receptors due to inhibition of the Na^+/H^+ -exchangers may favor the binding of albumin to its receptor. This is expressed by the initial faster kinetics of binding.

The fact that amiloride but not bafilomycin alters the initial binding kinetics, indicates that the Na^+/H^- -exchanger extrudes more protons in the lumen than the H^+ -pumps located on the BBM and may exert a marked effect on the pH of the microenvironment of coated pits. The local alkalization favored by amiloride would favor the binding of EB:albumin complexes to the receptors. However, in contrast to bafilomycin, amiloride did not affect the overall transport of albumin and EB accumulation (linear phase). This is not surprising since the Na^+/H^+ -exchangers are inserted in the endosomal milieu under a strict vectorial configuration, the amiloride-binding site being intra-endosomal [6, 13]. Amiloride cannot inhibit the Na^+/H^+ -exchanger when placed in the incubation medium but may enhance endosomal acidification when internalized into the endosomes [13]. Indeed, at this location, amiloride can inhibit the polarized Na^+/H^+ -exchanger which may otherwise contribute to the dissipation of the endosomal proton gradient created by the activity of proton pumps [6]. Therefore, amiloride internalized into endosomes should not reduce endosomal protein transport. Indeed, it only affected the extracellular binding of EB:albumin complexes to the BBM.

The total oligomycin-sensitive oxygen consumption by isolated tubules is due to the sum of various ATP-consuming processes which can be identified by their consecutive suppression with specific inhibitors. A non-phosphorylating, oligomycin-insensitive component of respiration also exists. We have extensively worked with ATP turnover in proximal tubules *in vitro* [15, 20]. In canine tubules, the ouabain-sensitive Na^+ , K^+ -ATPase requires 35% while the bafilomycin-sensitive phosphorylative respiration, H^+ -ATPase requires also 35% of the apparent ATP turnover. The bafilomycin-sensitive respiration reflects both ATP consumed to support proton transport by units present on the BBM and on endosomes. Bafilomycin suppressed completely the fraction of ATP turnover related to the activity of the proton pump as described elsewhere [15] but suppressed only in part albumin transport.

NH_4Cl increased the bafilomycin-sensitive component of respiration. By interfering with the endosomal accumulation of protons, NH_4Cl should indeed stimulate the activity of their proton pumps while no effect is expected on BBM-bound pumps which are not inhibited by a proton gradient. NH_4Cl simultaneously suppressed albumin transport despite stimulating the activity of the proton pumps. This confirms that the endosomal pH gradient and not the activity of the H^+ -pumps per se is important for transport since an inhibition of albumin transport is observed when the pump is inhibited (bafilomycin) or stimulated (NH_4Cl).

The application of ouabain before the addition of bafilomycin, as used here, stimulates the activity of the proton pump [6]. This was studied elsewhere and attributed to the increment of cellular Na^+ with secondary dissipation of the endosomal proton gradient through Na^+/H^+ exchange. In accord, this stimulation was shown to be abolished by intra-endosomal amiloride [13].

DIDS should reduce the bafilomycin-sensitive component of respiration by interfering with the dissipation of the membrane potential by chloride movements. This effect was not observed. In contrary, a modest stimulation was observed which was increased in presence of NH_4Cl (interaction DIDS and NH_4Cl , $p < 0.01$). This suggested that the pump is not inhibited by the membrane potential when DIDS (or $\text{DIDS} + \text{NH}_3$) diffuses in the endosomal space and binds the secreted protons. DNDS, NPPB and SITS had no effect on the bafilomycin-sensitive respiration as expected from their absence of effect on albumin transport: in both cases, poor membrane permeability at these agents could explain this observation.

Thus, our work demonstrates that at least two steps related to local pH are crucial for albumin transport in the proximal tubules *in vitro*: the luminal secretion of protons which modulates the binding of albumin to receptors and the endosomal acidification which modulates the overall reabsorption cycle. Our observations suggest that Na^+/H^+ -exchangers represent probably a more active mechanism for extracellular acidification than

the proton pumps in canine tubules despite the low population of exchangers on the BBM of this species, since amiloride, but not bafilomycin, interfered with the initial binding of luminal EB:albumin complexes.

Various physiologic parameters (osmolarity, glycation) may affect these processes and interfere with albumin transport. Our work demonstrates that even modest variation of osmolarity may influence the transport of albumin and that this may be significant with osmolarity changes observed in pathological state *in vivo*.

Acknowledgments

This work was supported by a grant (MT-7875) of the Medical Research Council of Canada. The financial support of "Fondation de l'Hôpital Notre-Dame" is gratefully acknowledged. The authors are grateful for the expert technical assistance of Mr. Jacques Sénécal and Mrs. Gisèle Grenier.

Bibliography

1. CHRISTENSEN EI, NIELSEN S, MOESTRUP SK, BORRE C, MAUNSBACH AB, DE HEER E, RONCO P, HAMMOND TG, VERROUST P: Segmental distribution of the endocytosis receptor gp330 in renal proximal tubules. *Eur J Cell Biol* 66:349-364, 1995
2. CAMARGO MJF, SUMPIO BE, MAACK T: Renal hydrolysis of absorbed protein: influence of load and lysosomal pH. *Am J Physiol* 247:F656-F664, 1984
3. CHAPPELL PG, KONFORTI BB, SCHMID SL, ROTHMAN JE: The ATPase core of a clathrin uncoating protein. *J Biol Chem* 262:746-751, 1987
4. CLAGUE MJ, URBE S, ANIENTO F, GRUENBERG J: Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation. *J Biol Chem* 269:21-24, 1994
5. DUPLAIN M, NOËL J, FLESER A, MARSHANSKY V, GOUGOUX A, VINAY P: Mechanisms of proximal proton secretion in BBM of herbivorous, omnivorous and carnivorous species. *Am J Physiol* 269:R104-R112, 1995
6. FLESER A, NOËL J, MARSHANSKY V, HOANG A, VINAY P: Cross-talk between the baso-lateral Na⁺, K⁺ and the luminal H⁺-ATPase in isolated proximal tubules. *Renal Physiol Biochem* 18:140-152, 1995
7. FORGAC M: Structure and function of vacuolar class of ATP-driven proton pumps. *Physiol Rev* 69:765-796, 1989
8. GALLOWAY CJ, DEAN GE, MARSH M, RUDNICK G, MELLMAN I: Acidification of macrophage and fibroblast endocytic vesicles in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:3334-3338, 1983

9. GEKLE M, SILBERNAGL S: Endosomal alcalinization reduces J_{max} and K_m of albumin receptor-mediated endocytosis in OK cells. *Am J Physiol* 268:F899-F906, 1995
10. HEUSER JE, ANDERSON RG: Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J Cell Biol* 108:389-400, 1989
11. MAACK T, PARK CH: Endocytosis and lysosomal hydrolysis of proteins in proximal tubules. *Methods Enzymol* 191:340-354, 1990
12. MAACK T, PARK CH, CAMARGO MJF: Renal filtration, transport and metabolism of proteins, in *The Kidney: physiology and pathophysiology*, edited by SELDIN DW, GIEBISCH G, New York, Raven Press, 1985, pp. 1773-1816
13. MARSHANSKY V, VINAY P: Proton gradient formation in early endosomes from proximal tubules. *Biochim Biophys Acta* 1284:59-73, 1996
14. MARSHANSKY V, FLESER A, NOËL J, BOURGOIN S, VINAY P: Isolation of heavy endosomes from proximal tubules in suspension. *J Membr Biol* 153:59-73, 1996
15. NOËL J, VINAY P, TEJEDOR A, FLESER A, LAPRADE R: Metabolic cost of bafilomycin-sensitive H^+ pump in intact dog, rabbit, and hamster proximal tubules. *Am J Physiol* 264:F655-F661, 1993
16. OKA JA, WEIGEL PH: Effect of hyperosmolarity on ligand processing and receptor recycling in the hepatic galactosyl receptor system. *J Cell Biochem* 36:169-183, 1988

17. PARK CH, CAMARGO MJF, MAACK T: Tubular handling of proteins. Absorption of albumin by isolated perfused proximal convoluted tubules of the rabbit, in *Proteinuria*, edited by AVRAM MM, New York-London, Plenum Medical Book Company, 1985, pp. 37-56
18. PARK CH, MAACK T: Albumin absorption and catabolism by isolated perfused proximal convoluted tubules of the rabbit. *J Clin Invest* 73:767-777, 1984
19. RENGEL M, RICHARD MO, MARSHANSKY V, VINAY P: Albumin transport by isolated proximal tubules in suspension. *Kidney Int* 1996 (submitted)
20. TEJEDOR A, NOËL J, VINAY P, BOULANGER Y, GOUGOUX A: Characterization and metabolism of canine proximal tubules, thick ascending limbs and collecting ducts in suspension. *Can J Physiol Pharmacol* 66:997-1009, 1988
21. VINAY P, NOËL J, TEJEDOR A, GOUGOUX A: Le métabolisme cellulaire in vitro: effets métaboliques méconnus. *M/S* 6:268-278, 1990
22. WALL DA, MAACK T: Endocytic uptake, transport and catabolism of proteins by epithelial cells. *Am J Physiol* 248:C12-C20, 1985

Figure captions

- Fig. 1.** *Inhibition of Evans Blue:albumin complexes uptake in cortical tubules by hyperosmolarity.* The hyperosmolarity (600 mOsm) was created by addition of sucrose. The tubules were studied at time 0, 15, 30, 60, 120, 180 min. (1= control (N=21); 2= sucrose (N=10)).
- Fig. 2.** *Transport of Evans Blue:albumin complexes in cortical tubules as a function of osmolarity.* The osmolarity was varied progressively from 300 to 600 mOsm with addition of sucrose. The tubules were studied at time 60 min, (N=3).
- Fig. 3.** *Transport of Evans Blue:albumin complexes in cortical tubules incubated 12.5 mg/mL albumin with a 7:1 EB:Alb molar ratio in absence of effectors (control) or in presence of amiloride (1 mM), bafilomycin (1 μ M), NH₄Cl (1mM), DIDS (100 μ M) or sucrose (300 mM).* The tubules were studied at time 0, 15, 30, 60, 120, 180 min. (1= amiloride (N=7); 2= control (N=21); 3= bafilomycin (N=6); 4= NH₄Cl (n=7); 5= sucrose (N=10); 6= DIDS (N=4)).
- Fig. 4.** *Effect of chloride channels inhibitors on the transport of EB:albumin complexes by cortical tubules in suspension incubated with 12.5 mg/mL albumin and a 7:1 EB:Alb ratio in absence of effectors (control) or in presence of DNDS (100 μ M), SITS (100 μ M), NPPB (100 μ M), DIDS (100 μ M).* The tubules were studied at time 0, 15, 30, 60, 120, 180 min. (1= DIDS (N=4); 2= control (N=21); 3= NPPB (N=5); 4= SITS (N=3); 5= DNDS (N=2)).

Figure 1.

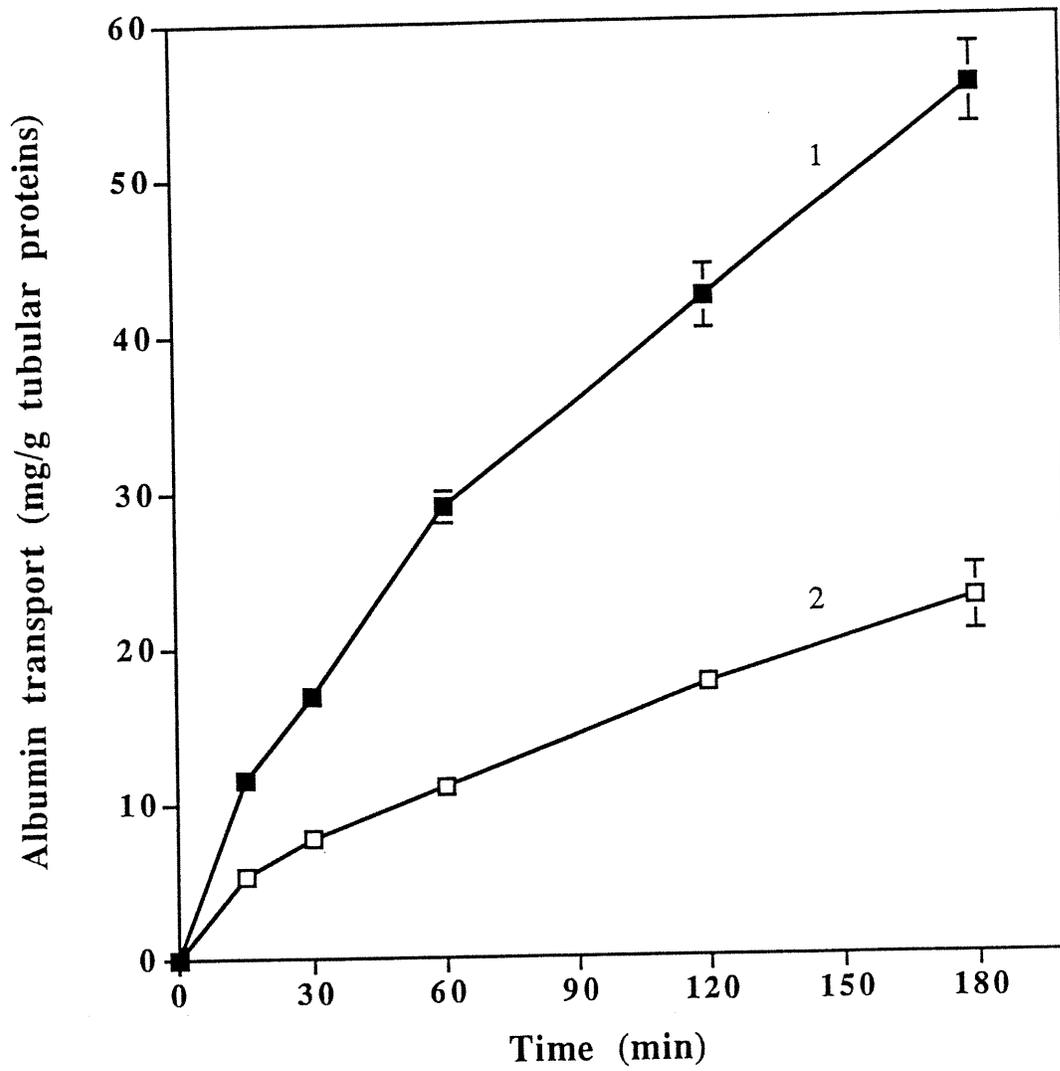


Figure 2.

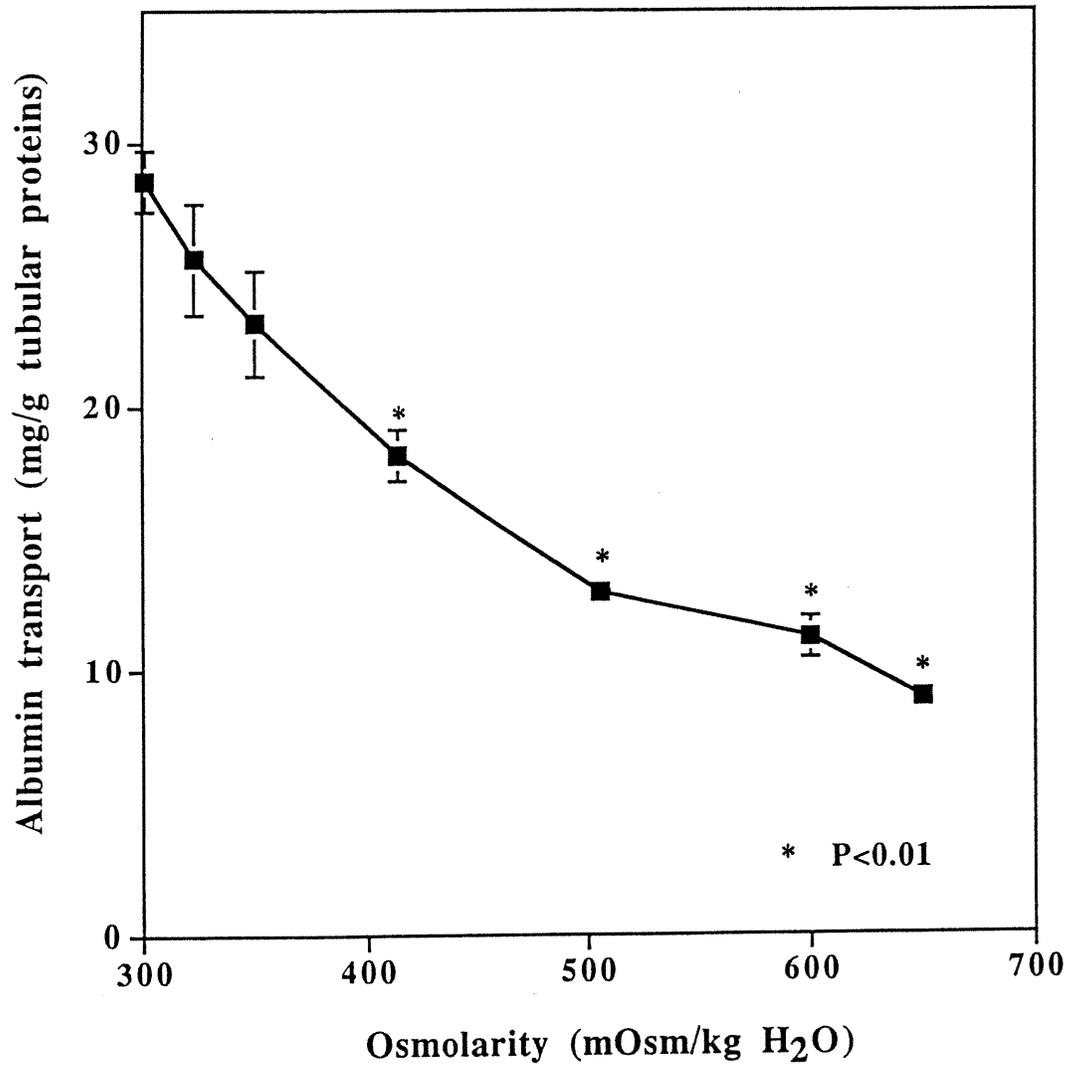


Figure 3.

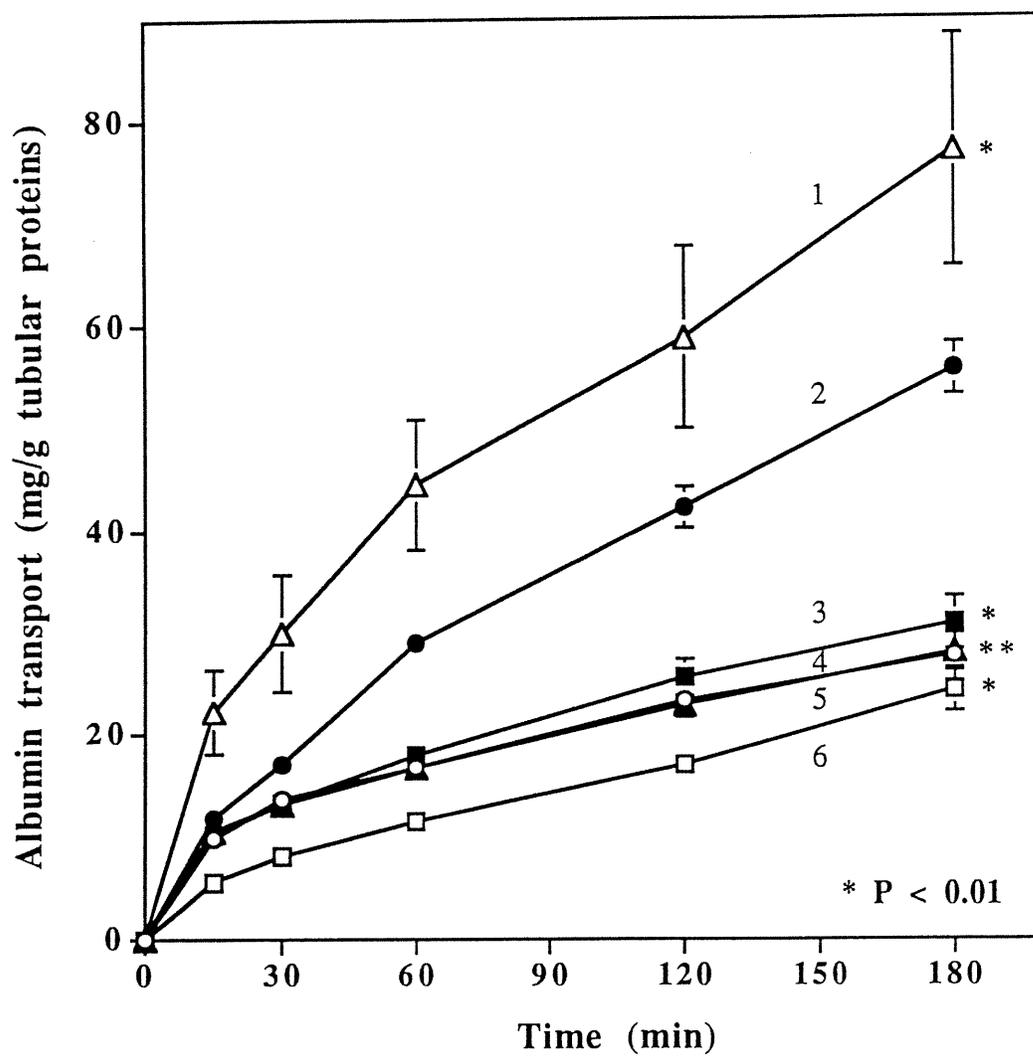


Figure 4.

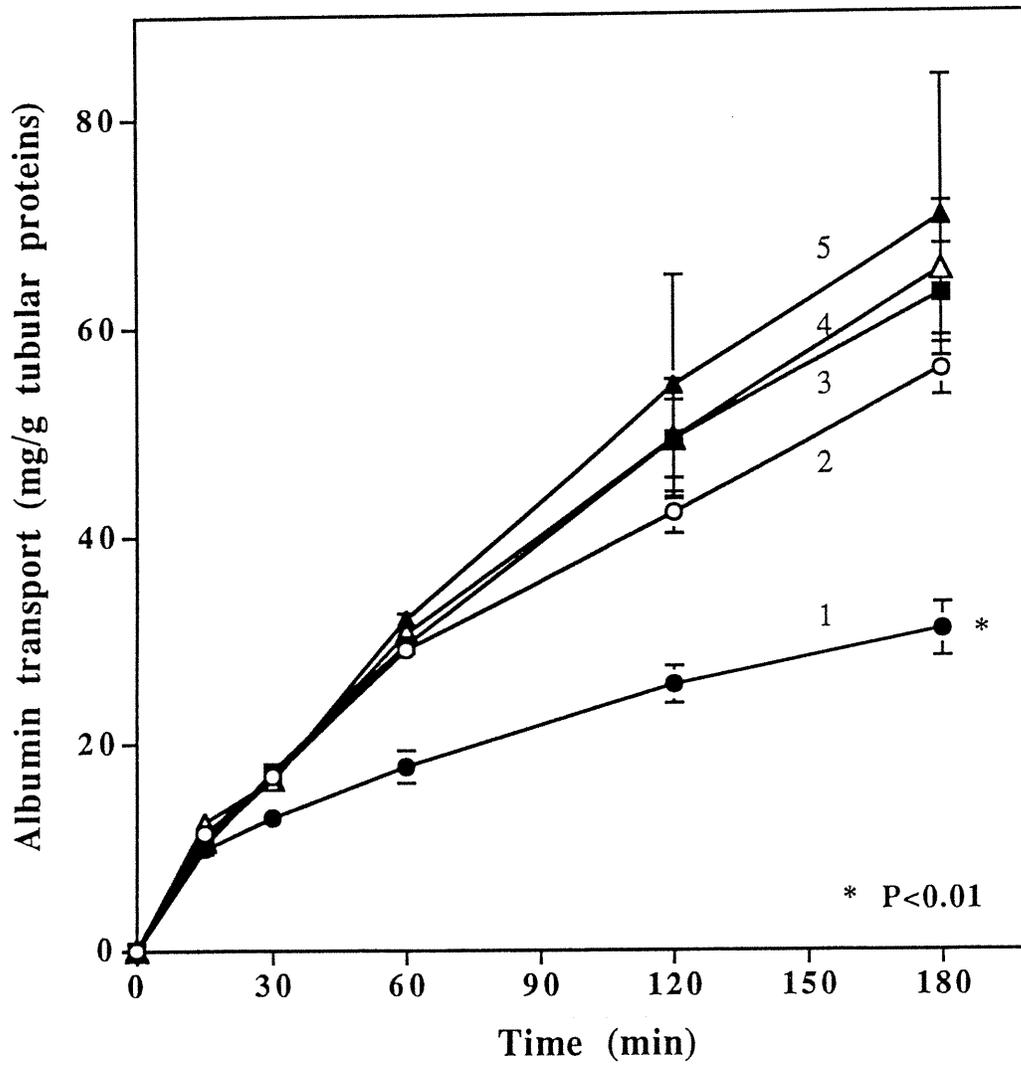


Table 1. Initial and late rate of apparent albumin transport

TIME (min)	CONTROL (N=21)	SUCROSE (N=10)	BAF (N=6)	NH ₄ Cl (N=7)	DIDS (N=4)	AMILORIDE (N=7)
0-15 min (Binding+transport)	770	110	640	690	660	1480
15-180 min (Transport)	240	100	90	100	110	300

Data express binding or transport as μg of albumin per g tubular protein

Table 2. Effect of sucrose, NH₄Cl and DIDS on the respiration of proximal tubules

	TOTAL RESPIRATION	PHOSPHORYLATING RESPIRATION (oligomycin-sensitive)	% OF TOTAL RESPIRATION	RESPIRATION ATTRIBUTABLE TO Na,K ATPase (ouabain-sensitive)	% OF PHOSPHORYLATING RESPIRATION	RESPIRATION ATTRIBUTABLE TO H ₂ ATPase (bafilomycin-sensitive)	% OF PHOSPHORYLATING RESPIRATION	RESPIRATION ATTRIBUTABLE TO Other ATPases	% OF PHOSPHORYLATING RESPIRATION	NON-PHOSPHORYLATING RESPIRATION (oligomycin-insensitive)	% OF TOTAL
A Control	325 ± 13 NS	250 NS	0.77	114 ± 9 NS	0.46	71 ± 6 NS	0.28	61 ± 6 NS	0.24	75 ± 6 NS	0.23
B Sucrose	302 ± 15 NS	221 NS	0.73	100 ± 5 NS	0.45	65 ± 7 NS	0.29	57 ± 3 NS	0.26	81 ± 10 NS	0.27
B-A											
C NH ₄ Cl	336 ± 11 NS	260 NS	0.77	76 ± 4 NS	0.29	96 ± 5 NS	0.38	86 ± 6 NS	0.33	76 ± 8 NS	0.23
C-A											
D DIDS	273 ± 13 NS	215 NS	0.75	81 ± 7 NS	0.44	75 ± 8 NS	0.37	79 ± 4 NS	0.19	68 ± 3 NS	0.25
D-A											
E NH ₄ Cl+DIDS	345 ± 15 NS	276 NS	0.80	89 ± 9 NS	0.32	106 ± 15 NS	0.38	81 ± 4 NS	0.29	69 ± 5 NS	0.20
E-A											

Data are μmol O₂ consumed per g wet weight and per hour.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Avant de commencer la discussion, il est nécessaire de rappeler quelques notions fondamentales sur l'albumine, utiles pour une meilleure compréhension des causes conduisant à une dysfonction du transport de l'albumine. Les hypothèses que nous émettons en découlent et nos résultats seront interprétés selon les données de la littérature actuelle et regroupés en trois volets correspondant aux grandes conclusions de notre étude i.e. que le transport de l'albumine est sensible à la variation de charge, sensible à l'osmolarité et sensible aux variations de pH endosomal et lysosomal. À partir de ces volets, nous interpréterons nos résultats et discuterons de leurs répercussions sur notre compréhension des mécanismes physiopathologiques liés à l'albumine chez les diabétiques. La discussion s'achèvera par des notions médicales sur l'albuminurie et ses conséquences qui peuvent mener, à long terme, à une insuffisance rénale.

1. Rappels

L'albumine est une protéine monocaténaire de 585 a.a. qui se comporte comme un acide faible (133), d'où sa facilité de liaison à de nombreuses molécules de l'organisme (hormones, ions, a.a., acides gras,...) (55). Elle est responsable de 80 % de la pression colloïdale osmotique (129) bien qu'elle ne constitue que \pm 50 % des substances oncotiquement actives (72). De plus, c'est la seule molécule dont les charges négatives varient significativement en fonction de l'équilibre acido-basique du sérum (55) et dont le transport est modifié par ses charges.

1.1. Filtration de l'albumine

Chez l'homme ou l'animal normal, l'albumine est significativement métabolisée par les reins. La filtration glomérulaire est la première étape dans la formation d'urine. À peu près 20 % du plasma circulant entrant dans le glomérule en ressort sous la forme d'un ultrafiltrat. La membrane basale glomérulaire (MBG) est la première barrière de filtration rénale et restreint le passage des protéines plasmatiques (PM supérieur à plusieurs centaines de Kd) dans l'urine. L'albumine et la paroi capillaire glomérulaire (PCG) sont polyanioniques, ce qui crée des répulsions électrostatiques entraînant un ralentissement de la filtration de l'albumine. Cependant, il demeure une concentration minime d'albumine (66 Kd) dans l'ultrafiltrat glomérulaire. La filtration glomérulaire normale de l'albumine estimée à moins de 20 g/ 24 h chez l'homme est faible par rapport à l'apport aux glomérules ($180 \text{ L}/24 \text{ h} \times 40 \text{ g/L} = 7200 \text{ g}/24 \text{ h}$). Si les 20 g d'albumine filtrée étaient rejetés dans l'urine, une protéinurie massive serait observée, ce qui n'est pas le cas chez l'individu sain. Un transport d'albumine se produit le long du néphron. Nous pouvons en déduire qu'un changement dans le transport tubulaire de l'albumine est susceptible de modifier considérablement l'albuminurie et ce, même en absence de changement de la filtration glomérulaire de cette protéine.

1.2. Réabsorption de l'albumine

L'albumine filtrée est réabsorbée par un processus d'endocytose dans les premiers centimètres du TP, ce qui empêche l'apparition d'une protéinurie chez l'homme normal. Ce processus est capable de transporter plus de 20 g d'albumine par 24 h. L'albumine se lie à un récepteur non spécifique (gp330) situé sur la BBM, dans des régions riches en puits tapissés de clathrine (Figure 2-10, page 66) (38). Il s'ensuit un processus d'internalisation de la membrane plasmique contenant les récepteurs liés aux molécules d'albumine et la formation de vésicules tapissées de clathrine (Figure 2-10, page 66). Celles-ci perdent ce

manteau de protéines grâce à une ATPase spécifique pour former des endosomes (57,63). L'activation d'une H^+ -ATPase membranaire provoque l'accumulation de protons dans l'endosome.

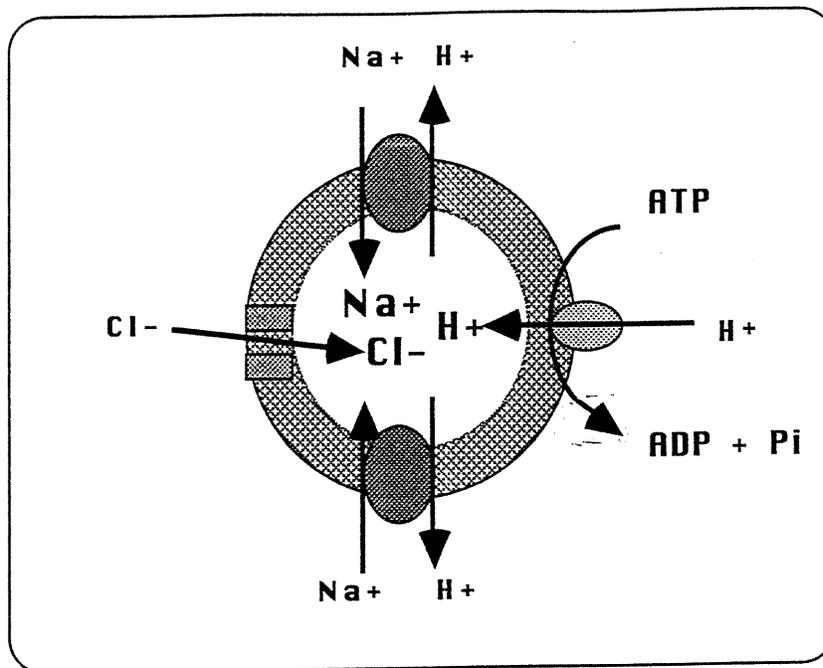


Figure 1. Systèmes de transport de protons dans les endosomes

Cette acidification brise le lien existant entre l'albumine et le récepteur, libérant l'albumine dans la lumière vésiculaire. Dernièrement, dans notre laboratoire, on a découvert que l'albumine commençait déjà à être dégradée dans les endosomes (66). Ces vésicules coalescent ensuite avec les lysosomes où, à un pH de 4-5, il y a activation des enzymes lysosomiales. L'albumine est ainsi transférée dans les lysosomes où des hydrolases acides (NAG, phosphatase acide), des protéinases (cathepsines B et L), des dipeptidases et des exopeptidases continuent le catabolisme de l'albumine en a.a.. Ceux-ci sont catabolisés dans les cellules des TP ou sont recyclés vers le foie pour resynthétiser de l'albumine. Les endosomes sont alors recyclés vers la MBB où ils fusionnent pour exposer de nouveau les récepteurs libres (Figure 2-10, page 66) (38). Au cours de ce processus, ils relarguent leur contenu enzymatique hydrolytique dans le liquide tubulaire.

L'augmentation des cathepsines urinaires peut être liée à une réabsorption accrue de protéines mais également à des problèmes de mort de cellules tubulaires (changements des propriétés de la membrane tubulaire (MBB, dans notre cas), glycation du NAG). Il y a également une augmentation de l'excrétion de β -glucuronidase, γ -glutamyl transférase, phosphatase alcaline et de lactate déshydrogénase.

Au niveau du filtrat du TP, ces enzymes protéolytiques (γ -glutamyl transférase, phosphatase alcaline,..) sont inactives à cause d'un pH ambiant de 7-7.4. Cependant, au niveau des cellules du TD, ils pourraient causer une dégradation de protéines extracellulaires car le pH de 4.5-5.5 les rend actives. Donc, nous pourrions supposer que dans le TD, une dégradation des segments luminaux de protéines membranaires, y compris les protéines impliquées dans le transport ionique, puisse survenir, suite à la lyse cellulaire et lysosomiale au niveau du TP. Ainsi, dans les cas de néphropathie diabétique, nous pourrions y voir une atteinte des boucles extracellulaires de la protéine-canal K^+ , suivie de son inactivation, ce qui pourrait expliquer l'hyperkaliémie fréquente des diabétiques. La vessie peut également être victime des enzymes lysosomiales libérées à cause du maintien d'un pH acide (5-5.5). Sa paroi qui présente de nombreux replis pourrait subir des altérations et devenir le refuge de bactéries (mycoplasma, streptocoques,...), permettant ainsi le développement de nombreuses infections urinaires. Ces effets secondaires sont connus mais n'ont pas été attribués à un transport proximal accru d'albumine.

1.3. Catabolisme de l'albumine

Le catabolisme local intracellulaire de l'albumine mène à une production et éventuellement à une oxydation de ses a.a. constitutifs dans le TP, i.e. à une production de NH_4^+ . Cette fonction est normalement finement réglée et assurée par le métabolisme de la glutamine.

Chez l'homme normal, dans les cellules du TP, la glutamine entre aussi bien du côté luminal que baso-latéral par un cotransporteur Na^+ -a.a. et est métabolisée en NH_4^+ et α -cétoglutarate. Le cétoglutarate est oxydé via le cycle de Krebs en CO_2 , produisant ainsi deux ions bicarbonates. Le NH_4^+ est éliminé dans les urines ou il pénètre largement sous forme de NH_3 dans des structures telles que les endosomes, un gaz capable d'abolir les gradients de pH.

Nous pouvons penser qu'une production non réglée de NH_4^+ suivant le catabolisme local d'acides aminés produits par le catabolisme de l'albumine aura comme conséquences:

- 1) une limitation des gradients de pH intra-organelles et ultimement un ralentissement du transport d'albumine (fluctuation secondaire de l'albuminurie);
- 2) une limitation du gradient de pH mitochondrial i.e. une interférence avec la production maximale d'ATP;
- 3) une interférence au niveau de la Na^+ - K^+ ATPase où le NH_4^+ peut remplacer le K^+ , d'où limitation du transport tubulaire;
- 4) une activation de mécanismes cellulaires influencés par le NH_4^+ et menant finalement à la fibrose cellulaire.

Deux mécanismes peuvent limiter l'oxydation désordonnée des a.a. de l'albumine:

- 1) chez les diabétiques en déséquilibre, les corps cétoniques (acétoacétate, β -hydroxybutyrate) sont dégradés, déplaçant le métabolisme des a.a. y compris la glutamine;
- 2) l'albumine est normalement chargée d'acides gras. En présence d'albuminurie, dans des situations décompensées du diabète, on fait face à une hyperlipidémie (62). Il y a aussi une relation inverse entre les concentrations sériques d'albumine et de cholestérol. L'excédent d'acides gras véhiculés par l'albumine se dirige dans les cellules du TP des côtés luminal et baso-latéral. Nous pouvons supposer que les acides gras relargués subissent également leur dégradation et produisent du CO_2 et ± 8 ATP par carbone (acide palmitique: 129 ATP), déplaçant ainsi le catabolisme des a.a. Une fraction importante des a.a. produits par la dégradation de l'albumine qui n'ont pas été localement catabolisés, serait alors larguée par le pôle baso-latéral vers la circulation et gagne le foie où les a.a.

synthétisent de nouvelles molécules d'albumine. Ce phénomène induit une accumulation cellulaire d'a.a. cationiques (Lys, Arg) (67). Ils auraient une action similaire à la bafilomycine: une inhibition de l'acidité endosomiale i.e. une interférence avec le transport d'albumine (article 1). Les a.a. cationiques causent en effet des défauts de transport analogues à ceux observés dans le syndrome de Fanconi.

S'il y a une plus grande destruction locale de l'albumine endocytée dans le TP et un langage baso-latéral accru, ceci implique une augmentation des a.a. dans les espaces intercellulaires. Une plus grande portion de ces a.a. pourrait repasser par les jonctions lâches de la membrane luminale vers l'urine. Un des systèmes de cotransport Na^+ -a.a. peut reprendre les a.a. de la lumière (102). Ce phénomène accentue la réabsorption proximale du Na^+ . La réabsorption du glucose filtré contribue également à une réabsorption accrue du Na^+ . De même, une partie du glucose réabsorbé en excès repasse par les jonctions lâches de la membrane luminale vers l'urine d'où il est à nouveau réabsorbé grâce à un cotransporteur Na^+ -glucose. Nous pensons que l'activation anormale des systèmes de transport des a.a. et du glucose dépendant du Na^+ dans les membranes lumineales des cellules du TP peut expliquer une réabsorption proximale accrue de Na^+ menant à une expansion du LEC et à une hyperfiltration chez les patients protéinuriques. Ces mécanismes sont générateurs d'oedèmes.

1.4. Transport de l'albumine

Le transport rénal de l'albumine est rapide. Il a été étudié sur des tubules proximaux (TP) isolés perfusés avec des a.a. marqués et des isotopes radioactifs (^{131}I , ^{14}C), par microponctions et microperfusions de reins de rat *in vivo* et par des techniques *in vitro* impliquant l'albumine fluorescente et la microscopie électronique. Nous avons développé une technique moins complexe qui utilise une suspension de TP au moyen de laquelle l'internalisation de l'albumine marquée au bleu Evans (BE) puis l'accumulation endosomiale et lysosomiale des complexes BE:albumine sont étudiées. La solubilisation

du tissu rénal par le triton X-100 effectuée après le lavage des tubules avec une solution d'albumine blanche 1% (pour en extraire le BE extracellulaire non lié) permet le relargage du BE lysosomal et de ce fait, la mesure du BE accumulé. Ceci constitue un index du transport tubulaire d'albumine plus fiable que le suivi de la captation d'albumine radioactive (marquage au ^{131}I , $^3\text{CH}_3$, ...) qui ne permet pas de faire la distinction entre l'albumine et ses produits de dégradation. L'utilisation de ce colorant comme marqueur est donc utile pour étudier le transport d'albumine dans le TP et nous l'avons employé dans nos expériences.

2. Résultats

Après avoir présenté et discuté du métabolisme rénal de l'albumine, nous abordons maintenant nos résultats portant sur les variations du transport d'albumine lié au BE en fonction de la variation de sa charge, de son osmolarité et des pH endosomal et lysosomal des cellules tubulaires.

2.1. Le transport d'albumine est sensible à la **variation de ses charges**.

Le BE est un colorant électronégatif. Ses groupements sulfonates en position 2, 4 se combinent avec le NH_4^+ des lysines de l'albumine (2), colorant l'albumine en bleu au détriment des charges cationiques. Nos travaux ont été entrepris avec des rapports molaires BE:albumine variant de 7:1 à 70:1 et montrent que 98.3 % du BE sont et demeurent liés à l'albumine. L'exposition tubulaire à des complexes BE:albumine présentant ces différents rapports molaires, conduit à une internalisation de ces complexes mais le transport n'est pas linéaire (article 1). En effet, initialement, nous notons une liaison rapide des complexes BE:albumine aux récepteurs du TP et/ou une liaison de 1.7 % de BE libre à des sites extracellulaires non spécifiques (0-15 min). Le tout est suivi d'une internalisation linéaire de ces complexes en fonction du temps (15-180 min).

Cependant, avec une teneur élevée de BE lié à l'albumine réduisant les charges cationiques, l'albumine est moins transportée (article 1). On sait, par la littérature publiée sur ce sujet, que plus l'albumine est cationique, moins il existe d'interactions répulsives entre l'albumine et les sites anioniques de la membrane luminale et plus l'accès de l'albumine aux sites d'endocytose à la base des microvillosités est facile. Cette raison nous a poussés à effectuer nos expériences avec un rapport molaire BE:albumine de 7:1, ce qui nous a permis d'évaluer le plus exactement possible le transport de l'albumine dans les TP.

Il a déjà été démontré que chaque molécule d'albumine porte jusqu'à 70 sites de liaison pour le BE qui s'y lie de façon non-covalente. Avec un rapport 1:1, nous avons calculé que 69 molécules de BE se liaient à une molécule d'albumine, ce qui confirme les études précédentes (59,98).

En corollaire, nous avons observé qu'une concentration de BE libre de 0.0125 mg/mL conduit à une petite liaison immédiate (12 %) aux membranes des TP. Il y a donc des sites de liaison à forte affinité pour le BE sur les membranes tubulaires. Plus la concentration de BE croît, plus le BE se lie aux cellules. Les récepteurs à plus haute affinité sont d'abord occupés et, en fonction de la concentration croissante de BE; il y a liaison à d'autres récepteurs ou sites de liaison moins spécifiques de liaison de moindre affinité. A une concentration de 12.5 mg/mL, l'association du BE aux membranes cellulaires est importante (article 1).

Le BE seul n'implique pas d'endocytose médiée par un récepteur, ce qui signifie que la quantité de BE présente dans la cellule tubulaire est petite et inférieure à celle trouvée avec des quantités croissantes d'albumine (article 1). Au contraire, plus la quantité de complexes BE lié à l'albumine croît, plus le BE s'accumule dans les cellules tubulaires par endocytose médiée par récepteur (article 1).

Cet effet du BE sur les charges de l'albumine est analogue à l'effet de la glycation. L'hyperglycémie induit, en effet, une diminution des sites anioniques des membranes glomérulaires à cause de la glycation des GAG (et de la diminution de leur synthèse), ce

qui cause une augmentation de la perméabilité de l'albumine. À long terme, la protéinurie excède souvent 10 g/j chez les diabétiques et conduit à une hypoalbuminémie.

Cet excès de glucose conduit à une glycation excessive de toutes les protéines (collagène IV, IV, protéines membranaires, albumine, complément, hémoglobine, IV, IV, LDL, transferrine, l' α_1 -antitrypsine, le fibrinogène) et des fractions plasmatiques protéiques. La glycation se caractérise par une réaction non-enzymatique entre le glucose et le ϵ -NH₂ des lysines de l'albumine. Elle est beaucoup plus importante chez le diabétique que chez l'homme sain. En parallèle à ce qui a été décrit ci-dessus, l'albumine glyquée est moins réabsorbée par le TP car il y a une diminution de ses charges positives, ce qui favorise donc l'albuminurie et ultérieurement, la protéinurie.

2.2. Le transport d'albumine est sensible à l'osmolarité.

L'osmolarité plasmatique normale s'élève à 285 mOsm. In vitro, nous avons montré que lorsque l'osmolarité est augmentée par apport de sucrose ou de NaCl, il y a suppression progressive du transport d'albumine. À 600 mOsm, nous ne notons plus qu'une petite accumulation de complexes insensible à l'osmolarité parce que possiblement, la liaison non spécifique de BE ou des complexes BE:albumine à la membrane cellulaire n'est pas affectée. In vitro, le sucrose n'a pas d'effets significatifs sur l'activité des H⁺-ATPases (et Na⁺-K⁺ ATPases). De plus, le sucrose n'a aucun effet significatif sur les composantes de la respiration et de ce fait, n'interfère pas avec le transport de l'albumine en inhibant une voie dépendant de l'ATP (article 2). Donc, l'endocytose médiée par un récepteur semble bien affectée par l'osmolarité. D'autres effets de l'osmolarité sont connus, y compris une inactivation des échangeurs Na⁺/H⁺. Étant donné que cet effet devrait stimuler et non réduire le cycle d'endocytose, les effets de l'osmolarité sur ces échangeurs ne sont probablement pas impliqués dans nos observations.

Il faut noter que les cellules du TP transportent normalement 0.9 mole glucose/jour (180 L x 5 mM glucose). Le transport atteint 2.7 moles glucose/jour (180 L x 15 mM

glucose) chez les patients diabétiques mal équilibrés i.e. hyperglycémiques. Dans les deux cas, le glucose entre dans la cellule par les cotransporteurs Na^+ -glucose et en ressort pour se diriger vers la circulation. Mais passé le T_m , le glucose n'est plus réabsorbé et termine sa course dans l'urine.

Chez les patients diabétiques, la glycémie peut atteindre 15-20 mM (glycémie normale: 5-7 mM) et en fonction de ce qui précède, nous pouvons supposer que cette hyperosmolarité pourrait donc interférer avec le transport d'albumine et accentuer l'albuminurie débutante qui peut conduire, dans des stades plus graves, à une protéinurie. Nos mesures montrent, en effet, une inhibition du transport d'albumine à faible hyperosmolarité.

La voie des polyols (minoritaire) augmente parce que le glucose peut également se transformer en sorbitol qui s'accumule dans les cellules. Il provoque une hyperosmolarité cellulaire qui se caractérise par une augmentation de la perméabilité membranaire, une altération cellulaire des potentiels rédox provoquant des dommages et des dysfonctions tissulaires. Le sorbitol peut, tout comme le glucose ou les AGE, se fixer à l'albumine, rendant sa réabsorption difficile et amplifiant l'albuminurie.

2.3. Le transport d'albumine est sensible à **la variation du pH endosomal et lysosomal**

L'action de substances telles que la bafilomycine (BAF), le DIDS, le NH_4^+ , l'amiloride qui sont susceptibles d'influencer le pH endosomal et, par conséquent, le transport d'albumine, a été étudiée.

La H^+ -ATPase retrouvée au niveau de la membrane apicale acidifie le milieu externe i.e. le microenvironnement où se situent les récepteurs et les protéines circulantes (albumine), si elle est localement active. Dans les endosomes et lysosomes, les protons sont pompés à l'intérieur afin d'y maintenir un bas pH et de libérer l'albumine de son récepteur.

La **bafilomycine** est capable d'inhiber l'activité de la H^+ -ATPase vacuolaire présente sur la MBB et les endosomes et supprime la synthèse d'ATP requise pour supporter l'activité des H^+ -ATPases. La BAF interfère avec le transport de l'albumine (article 2).

In vitro, le **NH_4Cl** interfère avec la formation de gradients de protons à travers les membranes endosomiales. Il génère du NH_3 qui diffuse dans les endosomes et capte les protons intra-vésiculaires provenant de la pompe H^+ -ATPase pour former du NH_4^+ . Le NH_4^+ empêche donc l'acidification lysosomiale. Le transport d'albumine en présence de NH_4Cl est identique à celui observé en présence de BAF ou de sucrose (article 2).

En ce qui concerne l'**amiloride**, son site de liaison étant intra-endosomal, il ne peut diminuer l'acidification endosomiale que lorsqu'il est internalisé dans les endosomes (article 2). A cet endroit, l'amiloride peut inhiber l'échangeur Na^+/H^+ qui est polarisé et qui ne peut plus dissiper le gradient de protons dans les endosomes créé par l'activité des H^+ -ATPases (article 2). Il favorise donc l'acidification endosomiale. L'internalisation de l'amiloride dans les endosomes ne réduit pas le transport de protéines (article 2). Cependant, l'amiloride affecte la liaison extracellulaire des complexes BE:albumine à la BBM. En effet, l'inhibition de l'échangeur diminue la concentration de protons dans le microenvironnement des récepteurs membranaires et cette alcalinisation accélère la liaison initiale des complexes aux tubules parce que l'affinité de l'albumine pour son récepteur est influencée par le pH (article 2). Cet effet n'est pas observé avec la BAF.

La présence essentielle de canaux Cl^- dans les endosomes permet de neutraliser le potentiel membranaire généré par la pompe à protons lorsqu'il y a acidification de l'espace endosomal (article 2). Le **DIDS**, molécule qui diffuse facilement dans les endosomes, est un inhibiteur du transport de Cl^- . L'inhibition des canaux Cl^- peut augmenter le potentiel membranaire et réduire l'acidification endosomiale ainsi que le transport d'albumine. Normalement, il devrait diminuer la synthèse d'ATP requise pour le maintien de l'activité des H^+ -ATPases puisque, en interférant avec la dissipation du potentiel membranaire par les mouvements ioniques du Cl^- , il devrait réduire la sécrétion

de protons (article 2). Ceci n'est pas observé. La respiration dépendant de l'activité des H^+ -ATPases n'est pas affectée par le DIDS et nous croyons que la diffusion de DIDS dans l'endosome maintiendrait l'activité des H^+ -ATPases. Il pourrait agir ici de la même façon que le NH_4Cl en acceptant des protons, en maintenant ou stimulant les activités de ces pompes sans produire d'acidification nette des endosomes. L'inhibition du transport produit par le DIDS est comparable à celle observée pour la BAF et le NH_4Cl . Le contrôle de l'acidification endosomiale ne dépend donc pas seulement de la pompe à protons mais également de l'activité d'une protéine responsable de la conductance passive du Cl^- (article 2).

Nous pouvons donc dire que l'addition de sucrose, de BAF, de DIDS ou de NH_4Cl affecte uniquement l'endocytose médiée par un récepteur. Cependant, il pourrait demeurer une endocytose en phase fluide indépendante du pH au niveau des membranes luminale et baso-latérale. L'utilisation de médicaments possédant les propriétés de la BAF, du NH_4^+ ou du DIDS pourrait donc créer une albuminurie mais protéger les reins des effets toxiques du catabolisme proximal de l'albumine.

En conclusion, à la suite de nos expériences, il apparaît que le mécanisme de transport de l'albumine est très influencé par le pH local au niveau de la BBM (liaison de l'albumine au récepteur) ainsi que par le pH endosomal (dissociation des complexes albumine:récepteur) et que l'inhibition des H^+ -ATPases ou de l'acidification des endosomes (nécessaire à la dissociation des complexes récepteur:ligand) diminue le transport de l'albumine (article 1).

3. Projections

Incontestablement, le diabète est la maladie où l'on rencontre le plus d'atteinte rénale liée à un trouble albuminurique. Aussi, en relation avec nos recherches, les spéculations qui suivent ont surtout été inspirées par ce problème.

L'albuminurie est le premier signe du développement d'une néphropathie diabétique. En plus de tous les autres facteurs cités précédemment, l'augmentation de la surface capillaire (vasodilatation de l'artériole afférente retrouvée dans le diabète), une augmentation de la perméabilité à l'albumine et autres protéines plasmatiques, une diminution du coefficient de tamisage capillaire, l'hypertension capillaire intraglomérulaire contribuent à la formation de la protéinurie. La perméabilité capillaire glomérulaire augmente à cause de l'augmentation de la pression transglomérulaire (53) et est un des autres facteurs qui provoque une augmentation de la filtration d'albumine et d'autres protéines (albuminurie->protéinurie) et donc, une hypoalbuminémie (62). Une réduction du transport d'albumine participe à la protéinurie. L'hypertension systémique résultante pourrait agir sur le compartiment vasculaire interstitiel vasodilaté qui, par une lésion capillaire primaire en relation avec la maladie, pourrait créer une oblitération progressive de certains capillaires (56). Parmi les anomalies causées par la néphropathie, figurent une augmentation de la synthèse de collagène, une diminution du "turn-over" de la membrane basale, des anomalies qualitatives et quantitatives des protéoglycans de la membrane basale, un excès de glycation de la membrane basale et d'autres protéines, une hyperfiltration glomérulaire, une accumulation de MBG dans les capillaires périphériques, une expansion de la matrice mésangiale, une diminution des sites anioniques régulant les propriétés de perméabilité sélectionnant les charges de la barrière de filtration glomérulaire et finalement, une perturbation de l'organisation de la matrice extracellulaire (42).

Les rats présentant une protéinurie induite par des injections quotidiennes de sérumalbumine bovine, situation similaire à celle retrouvée chez les diabétiques décompensés, développent une inflammation interstitielle et une fibrose (54). Certains patients souffrant de myélome et réabsorbant des chaînes légères de γ -globulines présentent le même problème. Ceci nous laisse suggérer que la protéinurie conduise à une tubulopathie puis à une néphropathie.

D'autre part, les AGE, produits finaux de la glycation, se lient irréversiblement aux protéines et continuent de s'accumuler sur ces dernières même après l'obtention d'une normoglycémie. Ils stimulent la prolifération de plusieurs types cellulaires, la synthèse de composants matriciels et interagissent avec certains récepteurs cellulaires. Les AGE ordonnent la sécrétion de facteurs de croissance (PDGF) qui stimulent la mitogénèse et l'hyperplasie cellulaire, phénomènes présents lors de lésions rénales telles que la néphropathie diabétique. La sécrétion du facteur de croissance induite par les AGE et contrôlée par le récepteur des macrophages, cellules endothéliales et plaquettes pourrait conduire à une occlusion de la lumière vasculaire par une augmentation de la production de composants de la matrice (épaississement de la matrice), une prolifération cellulaire et un dépôt de fibrine, également présents lors de lésions rénales. De plus, la liaison de complexes protéine-AGE à la MBG et aux autres composés de la matrice provoque un moins bon métabolisme enzymatique des protéines par les cathepsines et donc, une accumulation de ces protéines, d'où l'épaississement de la matrice. Ceci peut contribuer à réduire l'efficacité du transport rénal d'albumine.

Le système rénine-angiotensine, chez les diabétiques, en produisant une augmentation du taux d'angiotensine II dans le tissu rénal, joue un rôle important dans la pathogénèse de la fibrose tubulo-interstitielle (82). Les cellules du TP produiraient des quantités considérables d'angiotensine locale (168) qui endommage le rein en augmentant la pression de filtration glomérulaire (89). Chez le diabétique, il y a une augmentation localisée autocrine d'angiotensine II au niveau de l'artériole efférente post-glomérulaire qui provoque une hyperfiltration de l'albumine. Donc, le catabolisme de l'albumine et la formation locale d'a.a. augmenteront à cause d'une augmentation du transport de l'albumine.

Une fibrose peut être provoquée non seulement par le NH_4^+ et la production autocrine locale d'angiotensine mais également par des molécules telles que les cytokines, les facteurs de croissance (PDGF) et certains types de lymphocytes.

Pour diminuer les risques de problèmes rénaux et donc de protéinurie chez les diabétiques, il est nécessaire de contrôler parfaitement la glycémie par un régime strict. Cependant, une normoglycémie est très difficile à maintenir chez ces patients. Si des lésions, notamment au niveau rénal commencent à se développer, la prise d'ACEI tend à les restreindre. En effet, l'administration chronique d'ACEI inhibe la progression d'insuffisance rénale chez les diabétiques de types I et II (74). Nous avons postulé que la régression de l'albuminurie observée chez les patients diabétiques hyper- et normotendus après l'utilisation d'ACEI pourrait être reliée à une augmentation de la réabsorption tubulaire de protéines induite par ces agents. Pour tester cette hypothèse, un modèle in vitro consistant en TP de chiens en suspension a été utilisé, avec comme colorant le BE. Tous les ACEI que nous avons testés (enalaprilate, lysinopril, captopril) de même que les ionophores calciques et l'angiotensine II ne démontrent aucun effet sur le transport d'albumine dans le TP de l'animal normal.

L'effet bénéfique apparent des ACEI sur la microalbuminurie devra être attribué à l'effet de ces agents sur l'hydrodynamique glomérulaire (réduction de l'hypertension glomérulaire) et non un effet tubulaire direct sur la réabsorption de protéines. Les ACEI préserveraient la structure et fonction des néphrons (74) et inhiberaient la production d'angiotensine II impliquée dans les processus inhérents à l'hypertension. Il pourrait y avoir une activation locale intra-rénale du système rénine-angiotensine dans le diabète (74) d'où la nécessité de traiter les diabétiques avec un ACEI et antagoniste du récepteur de l'angiotensine II. De plus, l'utilisation de l'ACEI et d'un antagoniste du récepteur de l'angiotensine II améliorerait la fibrose tubulo-interstitielle (92).

Considérant les résultats de nos recherches et des constatations relevées dans la littérature, il semble donc que **l'albuminurie soit responsable d'une tubulopathie qui contribue inexorablement au développement d'une néphropathie.**

BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

1. *The Merck index*. New Jersey: Merck & Co., 1989, p. 614.
2. ALLEN, T. H. AND P. D. ORAHOVATS. Combination of toluidine dye isomers with plasma albumin. *Am. J. Physiol.* 161: 473-482, 1950.
3. ANDERSON, S., D. L. GARCIA, AND B. M. BRENNER. Renal and systemic manifestations of glomerular disease. In: *The kidney*, edited by B. M. Brenner and F. C. Rector. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1991, p. 1831-1870.
4. ARONSON, P. S. AND S. M. KUO. Heterogeneity of anion exchangers mediating chloride transport in the proximal tubule. *Ann. NY. Acad. Sci.* 574: 96-101, 1989.
5. ARONSON, P. S., J. NEE, AND M. A. SUHM. Modifier role of internal H⁺ in activating the Na⁺-H⁺ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *Nature* 299: 161-163, 1982.
6. ATKINSON, M. A., M. A. BOWMAN, K. J. KAO, L. CAMPBELL, P. J. DUSH, S. C. SHAH, O. SIMELL, AND N. K. MACLAREN. Lack of immune responsiveness to bovin serum albumin in insulin-dependent diabetes. *N. Engl. J. Med.* 329: 1853-1858, 1993.
7. AVRAM, M. M. Malignant proteinuria. A newly described syndrome and its management with medical nephrectomy. In: *Proteinuria*, edited by M. M. Avram. New York-London: Plenum Medical Book Company, 1985, p. 195-207.
8. BALLMER, P. E., M. A. MCNURLAN, E. MILNE, S. D. HEYS, V. BUCHAN, A. G. CALDER, AND P. J. GARLICK. Measurement of albumin synthesis in humans: a new approach employing stable isotopes. *Am. J. Physiol.* 259: E797-E803, 1990.

9. BARICOS, W. H., Y. ZHOU, R. W. MASON, AND A. J. BARRETT. Human kidney cathepsins B and L. Characterization and potential role in degradation of glomerular basement membrane. *Biochem. J.* 252: 301-304, 1988.
10. BARICOS, W. H., Y. W. ZHOU, R. S. FUERST, A. J. BARRETT, AND S. V. SHAH. The role of aspartic and cysteine proteinases in albumin degradation by rat kidney cortical lysosomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 256: 687-691, 1987.
11. BAUM, M., D. BIEMESDERFER, D. GENTRY, AND P. S. ARONSON. Ontogeny of rabbit renal cortical NHE-3 and NHE-1: effect of glucocorticoids. *Am. J. Physiol.* 268: F815-F820, 1995.
12. BAUM, M., O. W. MOE, D. L. GENTRY, AND R. J. ALPERN. Effect of glucocorticoids on renal cortical NHE-3 and NHE-1 mRNA. *Am. J. Physiol.* 267: F437-F442, 1994.
13. BELFIORE, F., A. M. RABUAZZO, S. IANNELLO, R. CAMPIONE, AND D. VASTA. Cathepsin D and other hydrolases in the kidney of streptozotocin-diabetic mice. Possible relevance to microangiopathy. *Hormone & Metabolic Res.* 17: 435-437, 1985.
14. BENT-HANSEN, L., B. FELDT-RASMUSSEN, A. KVERNELAND, AND T. DECKERT. Plasma disappearance of glycated and non-glycated albumin in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: evidence for charge dependent alterations of the plasma to lymph pathway. *Diabetologia* 36: 361-363, 1993.
15. BERTOLATUS, J. A. AND L. G. HUNSICKER. Polycation binding to glomerular basement membrane. Effect of biochemical modification. *Lab. Invest.* 56: 170-179, 1987.
16. BIAGI, B. A. Effects of the anion transport inhibitor, SITS, on the proximal straight tubule of the rabbit perfused in vitro. *J. Membr. Biol.* 88: 25-31, 1985.

17. BIANCHINI, L., A. KAPUS, S. WASAN, S. WAKABAYASHI, J. POUYSSÉGUR, F. H. YU, J. ORLOWSKI, AND S. GRINSTEIN. Responsiveness of mutants of the NHE-1 isoform of the Na^+/H^+ antiport to osmotic stress. *Am. J. Physiol.* 269: C998-C1007, 1995.
18. BIEMESDERFER, D., J. PIZZONIA, A. ABU-ALFA, M. EXNER, R. REILLY, P. IGARASHI, AND P. S. ARONSON. NHE3: a Na^+/H^+ exchanger isoform of renal brush border. *Am. J. Physiol.* 265: F736-F742, 1993.
19. BIEMESDERFER, D., R. F. REILLY, M. EXNER, P. IGARASHI, AND P. S. ARONSON. Immunocytochemical characterization of Na^+/H^+ exchanger isoform NHE-1 in rabbit kidney. *Am. J. Physiol.* 263: F833-F840, 1992.
20. BITENSKY, M. W., A. KOWLURU, AND R. A. KOWLURU. Non-enzymatic glycation and protein recognition. *Prog. Clin. Biol. Res.* 304: 185-203, 1989.
21. BOURDEAU, J. E. AND F. A. CARONE. Contraluminal serum albumin uptake in isolated perfused renal tubules. *Am. J. Physiol.* 224: 399-404, 1973.
22. BOWMAN, B. H. Acute-phase reactants. In: *Hepatic plasma proteins. Mechanisms of function and regulation*, San Diego-New York-Boston-London-Sydney-Tokyo-Toronto: Harcourt Brace Jovanovich, 1993, p. 50-96.
23. BOWMAN, E. J., A. SIEBERS, AND K. ALTENDORF. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7972-7976, 1988.
24. BRANT, S. R., C. H. YUN, M. DONOWITZ, AND C. M. TSE. Cloning, tissue distribution and functional analysis of the human Na^+/H^+ exchanger isoform, NHE3. *Am. J. Physiol.* 269: C198-C206, 1995.

25. BRENNER, B. M. AND L. D. DWORKIN. Glomerular permselectivity. In: *Proteinuria*, edited by M. M. Avram. New York-London: Plenum Medical Book Company, 1985, p. 3-15.
26. BROWN, J. R. Serum albumin: amino acid sequence. In: *Albumin structure, function and uses*, edited by V. M. Rosenoer, M. Oratz, and M. A. Rothschild. New York: Pergamon Press, 1977, p. 27-51.
27. BRUNSCHWIG, A., R. L. SCHMITZ, AND T. H. CLARKE. Intravital staining of malignant neoplasms in man by Evans blue. *Arch. Pathology* 30: 902-907, 1940.
28. BUNDSCHUH, I., I. JACKLE-MEYER, E. LUNEBERG, C. BENTZEL, R. PETZOLDT, AND H. STOLTE. 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, 1992.
29. BURCKHARDT, G. AND D. G. WARNOCK. Mechanism of H⁺ secretion in the proximal convoluted tubule. *Semin. Nephrol.* 10: 93-103, 1990.
30. CAMARGO, M. J. F., B. E. SUMPPIO, AND T. MAACK. Renal hydrolysis of absorbed protein: influence of load and lysosomal pH. *Am. J. Physiol.* 247: F656-F664, 1984.
31. CARTER, D. C. AND X. M. HE. Structure of human serum albumin. *Science* 249: 302-303, 1990.
32. CESSAC, A. L., M. PERICHON, J. SCHAEVERBEKE, AND H. BAKALA. AGE-related changes in albumin binding by renal brush-border membrane vesicles. *Mech. Ageing Dev.* 70: 139-148, 1993.
33. CHEN, L. K. AND W. F. BORON. Intracellular pH regulation in epithelial cells. *Kidney Int.* 33: S11-S17, 1991.

34. CHINARD, F. P., H. D. LAUSON, AND H. A. EDER. Relationship of the renal clearances of T-1824 and of albumin in some patients with proteinuria. *J. Clin. Invest.* 31: 895-900, 1952.
35. CHINARD, F. P., H. D. LAUSON, AND H. A. EDER. Evans blue (T-1824) and albumin clearances. *J. Applied Physiol.* 73: 1695-1696, 1992.
36. CHRISTENSEN, E. I. Rapid protein uptake and digestion in proximal tubule lysosomes. *Kidney Int.* 10: 301-310, 1976.
37. CHRISTENSEN, E. I. AND A. B. MAUNSBACH. Intralysosomal digestion of lysozyme in renal proximal tubule cells. *Kidney Int.* 6: 396-407, 1974.
38. CHRISTENSEN, E. I., S. NIELSEN, S. K. MOESTRUP, C. BORRE, A. B. MAUNSBACH, E. DE HEER, P. RONCO, T. G. HAMMOND, AND P. VERROUST. Segmental distribution of the endocytosis receptor gp330 in renal proximal tubules. *Eur. J. Cell Biol.* 66: 349-364, 1995.
39. CHRISTENSEN, E. I., H. G. RENNKE, AND F. A. CARONE. Renal tubular uptake of protein: effect of molecular charge. *Am. J. Physiol.* 244: F436-F441, 1983.
40. CLARK, J. D. AND J. E. LIMBIRD. Na⁺-H⁺ exchanger subtypes: a predictive review. *Am. J. Physiol.* 261: C945-C953, 1991.
41. CLAUSEN, D. F. AND N. LIFSON. Determination of evans blue dye in blood and tissues. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 91: 11-14, 1956.
42. COHEN, M. P. Diabetic nephropathy and the polyol pathway. In: *Current status of prevention and treatment of diabetic complications*, edited by N. Sakamoto, K. G. M. M. Alberti, and N. Hotta. Amsterdam-New York-Oxford: Excerpta Medica, 1990, p. 206-212.

43. COMBE, CH. AND M. APARICIO. Le métabolisme protéique au cours du syndrome néphrotique. Influence expérimentale et clinique de l'apport protéique alimentaire. *Néphrologie* 14: 171-175, 1993.
44. CONNOLLY, D. C. AND E. H. WOOD. Simultaneous measurement of the appearance and disappearance of T-1824 (Evans Blue) in blood and tissue after intravenous injection in man. *J. Applied Physiol.* 7: 73-83, 1954.
45. COUNILLON, L., H. J. LANG, AND J. POUYSSÉGUR. Pharmacological characterization of stably transfected Na⁺/H⁺ antiporter isoforms using amiloride analogs and a new inhibitor exhibiting anti-ischemic properties. *Molec. Pharmacol.* 44: 1041-1045, 1993.
46. CRIDER, B. P., X. S. XIE, AND D. K. STONE. Bafilomycin inhibits proton flow through the H⁺ channel of vacuolar proton pumps. *J. Biol. Chem.* 269: 17379-17381, 1994.
47. DAHL, D. C., T. TSAO, AND R. RABKIN. Ammonium chloride increases kidney cell protein content. *Miner. Electrolyte Metab.* 18 (2-5): 104-107, 1992.
48. DARNELL, J., H. LODISH, AND D. BALTIMORE. Manipulating macromolecules. In: *Molecular cell biology*, New York: W.H. Freeman and Co., 1990, p. 189-225.
49. DARVISH, N., J. WINAVER, AND D. DAGAN. Diverse modulations of chloride channels in renal proximal tubules. *Am. J. Physiol.* 267: F716-F724, 1994.
50. DEDOV, I. I., N. A. MUKHIN, M. A. PALTSEV, L. N. DELEKTORSKAIA, AND M. V. SHESTAKOVA. Urinary enzymes as a marker of the preclinical stage of diabetic nephropathy. *Terapevticheskii Arkhiv* 61: 73-76, 1989.
51. DIMENT, S., M. S. LEECH, AND P. D. STAHL. Cathepsin D is membrane-associated in macrophage endosomes. *J. Biol. Chem.* 263: 6901-6907, 1988.

52. DIMENT, S., K. J. MARTIN, AND P. D. STAHL. Cleavage of parathyroid hormone in macrophage endosomes illustrates a novel pathway for intracellular processing of proteins. *J. Biol. Chem.* 264: 13403-13406, 1989.
53. DITZEL, J. Glomerular and tubular alterations in the kidney in diabetes. In: *Diabetes 1985*, edited by M. Serrano-Rios and P. J. Lefèvre. Amsterdam-New York-Oxford: Elsevier Science Publishers, 1986, p. 699-702.
54. EDDY, A. A. Experimental insights into the tubulointerstitial disease accompanying primary glomerular lesions. *J. Am. Soc. Nephrol.* 5: 1273-1287, 1994.
55. FIGGE, J., T. H. ROSSING, AND V. FENCL. The role of serum proteins in acid-base equilibria. *J. Lab. Clin. Med.* 117: 453-467, 1991.
56. FINE, L. G., A. C. ONG, AND J. T. NORMAN. Mechanisms of tubulo-interstitial injury in progressive renal diseases. *Eur. J. Clin. Invest.* 23: 259-265, 1993.
57. FORGAC, M. Structure and function of vacuolar class of ATP-driven proton pumps. *Physiol. Rev.* 69: 765-796, 1989.
58. FORGAC, M. Structure, function and regulation of the coated vesicle V-ATPase. *J. Exp. Biol.* 172: 155-169, 1992.
59. FREEDMAN, F. B. AND J. A. JOHNSON. Equilibrium and kinetic properties of the Evans blue-albumin system. *Am. J. Physiol.* 216: 675-681, 1969.
60. FREINKEL, N., G. E. SCHREINER, AND J. W. ATHENS. Simultaneous distribution of T-1824 and I¹³¹-labelled human serum albumin in man. *J. Clin. Invest.* 32: 138-148, 1953.
61. FRELIN, C., P. VIGNE, P. BARBRY, AND M. LAZDUNSKI. Molecular properties of amiloride action and of its Na⁺ transporting targets. *Kidney Int.* 32: 785-793, 1987.

62. GABRIEL, R. Nephrotic syndrome. In: *Postgraduate nephrology*, London-Boston-Durban-Singapore-Sydney-Toronto-Wellington: Butterworths, 1985, p. 117-131.
63. GALLOWAY, C. J., G. E. DEAN, M. MARSH, G. RUDNICK, AND I. MELLMAN. Acidification of macrophage and fibroblast endocytic vesicles in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3334-3338, 1983.
64. GANAPATHY, V. AND F. H. LEIBACH. Protons and regulation of biological functions. *Kidney Int.* 40: S4-S10, 1991.
65. GANONG, W. F. Other endocrine organs. In: *Review of medical physiology*, Norwalk-Connecticut/San Mateo, California: Appleton & Lange, 1991, p. 426-430.
66. GIBSON, J. G. AND W. A. EVANS. Clinical studies of the blood volume. I. Clinical application of a method employing the azo dye Evans blue and the spectrophotometer. *J. Clin. Invest.* 16: 301-316, 1937.
67. GLASSOCK, R. J. Normal physiology and pathophysiology of proteinuria. In: *The nephrotic syndrome*, edited by J. S. Cameron and R. J. Glassock. New York-Basel: Marcel Dekker, Inc., 1994, p. 219-249.
68. GLUCK, S. AND J. CALDWELL. Immunoaffinity purification and characterization of vacuolar H⁺ ATPase from bovine kidney. *J. Biol. Chem.* 262: 15780-15789, 1987.
69. GREGERSEN, M. I. AND R. A. RAWSON. The disappearance of T-1824 and structurally related dyes from the blood stream. *Am. J. Physiol.* 138: 698-707, 1943.
70. GRINSTEIN, S., D. ROTIN, AND M. J. MASON. Na⁺/H⁺ exchange and growth factor-induced cytosolic pH changes. Role in cellular proliferation. *Biochim. Biophys. Acta* 988: 73-91, 1989.

71. GRINSTEIN, S., R. J. TURNER, M. SILVERMAN, AND A. ROTHSTEIN. Inorganic anion transport in kidney and intestinal brush border and basolateral membranes. *Am. J. Physiol.* 238: F452-F460, 1980.
72. GRUNERT, A. Colloid osmotic pressure and albumin metabolism during parenteral nutrition. *Curr. Stud. Hematol. Blood Transf.* 53: 18-32, 1986.
73. HAGGERTY, J. G., N. AGARWAL, R. F. REILLY, E. A. ADELBERG, AND C. W. SLAYMAN. Pharmacologically different Na/H antiporters on the apical and basolateral surfaces of cultured porcine kidney cells (LLC-PK₁). *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85: 6797-6801, 1988.
74. HARRIS, R. C. AND M. MARTINEZ-MALDONADO. Angiotensin II- mediated renal injury. *Miner. Electrolyte Metab.* 21: 328-335, 1995.
75. HARVEY, B. J. AND J. EHRENFELD. Epithelial pH and ion transport by proton pumps and exchangers. *CIBA Foundation Symposium* 139: 139-164, 1988.
76. HE, X. M. AND D. C. CARTER. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* 358: 209-215, 1992.
77. HELMLE-KOLB, C., L. COUNILLON, D. ROUX, J. POUYSSÉGUR, B. MRKIC, AND H. MURER. Na/H exchange activities in NHE1-transfected OK-cells: cell polarity and regulation. *Eur. J. Physiol.* 425: 34-40, 1994.
78. HEUSER, J. E. AND R. G. ANDERSON. Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J. Cell Biol.* 108: 389-400, 1989.
79. HOFMAN, W. AND W. G. GUDER. Urinary proteins in patients with diabetes mellitus. *Klinische Wochenschrift* 67: 37-39, 1989.
80. HOWLIN, K. J., R. J. ALPERN, AND F. C. RECTOR. Amiloride inhibition of proximal tubular acidification. *Am. J. Physiol.* 248: F773-F778, 1985.

81. HUOT, S. J., D. CASSEL, D. IGARASHI, E. J. CRAGOE, C. W. SLAYMAN, AND P. S. ARONSON. Identification and purification of a renal amiloride-binding protein with properties of the $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchanger. *J. Biol. Chem.* 264: 683-686, 1989.
82. ISHIDOYA, S., J. MORRISSEY, R. MC CRACKEN, A. REYES, AND S. KLAHR. Angiotensin II receptor antagonist ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis caused by unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 47: 1285-1294, 1995.
83. IVES, H. E., V. J. YEE, AND D. G. WARNOCK. Mixed type inhibition of the renal $\text{Na}^+\text{/H}^+$ antiporter by Li^+ and amiloride. *J. Biol. Chem.* 258: 9710-9716, 1983.
84. JARNUM, S. AND K. B. JENSEN. Distribution and degradation of albumin. In: *Clinical aspects of albumin*, edited by S. H. Yap, C. L. H. Majoor, and J. H. M. Van Tongeren. The Hague: Martinus Nijhoff Medical Division, 1978, p. 81-96.
85. JØRGENSEN, P. L. Structure, function and regulation of Na, K-ATPase in the kidney. *Kidney Int.* 29: 10-20, 1986.
86. KAPUS, A., S. GRINSTEIN, S. WASAN, R. KANDASAMY, AND J. ORLOWSKI. Functional characterization of three isoforms of the $\text{Na}^+\text{/H}^+$ exchanger stably expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 269: 23544-23552, 1994.
87. KAYSEN, G. A. Albumin metabolism in the nephrotic syndrome: the effect of dietary protein intake. *Am. J. Kidney Dis.* XII: 461-480, 1988.
88. KAYSEN, G. A., B. D. MYERS, W. G. COUSER, R. RABKIN, AND J. M. FELTS. Biology of disease. Mechanisms and consequences of proteinuria. *Lab. Invest.* 54: 479-498, 1986.
89. KETTELER, M., N. A. NOBLE, AND W. A. BORDER. Transforming growth factor-beta and angiotensin II: the missing link from glomerular hyperfiltration to glomerulosclerosis? *Annual Rev. Physiol.* 57: 279-295, 1995.

90. KINNE-SAFFRAN, E. Renal H⁺ ATPases. *Ann. NY. Acad. Sci.* 574: 189-200, 1989.
91. KINSELLA, J. L. AND P. S. ARONSON. Interaction of NH₄⁺ and Li⁺ with the renal microvillus membrane Na⁺-H⁺ exchanger. *Am. J. Physiol.* 241: C220-C226, 1981.
92. KLAHR, S., S. ISHIDOYA, AND J. MORRISSEY. Role of angiotensin II in the tubulointerstitial fibrosis of obstructive nephropathy. *Am. J. Kidney Dis.* 26: 141-146, 1995.
93. KLANKE, C. A., D. F. SU, D. F. CALLEN, Z. WANO, P. MENETON, N. BAIRD, R. A. KANDASAMY, J. ORLOWSKI, B. E. OTTERUD, M. LEPPERT ET AL. Molecular cloning and physical and genetic mapping of a novel human Na⁺/H⁺ exchanger (NHE5/SLC9A5) to chromosome 16q22.1. *Genomics* 25: 615-622, 1995.
94. KLEYMAN, T. R. AND E. J. CRAGOE. Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *J. Membr. Biol.* 105: 1-21, 1988.
95. KOSCHIER, F. J., M. F. STOKOLS, J. M. GOLDINGER, M. ACARA, AND S. K. HONG. Effect of DIDS on renal tubular transport. *Am. J. Physiol.* 238: F99-F106, 1980.
96. KRAGH-HANSEN, U. Structure and ligand binding properties of human serum albumin. *Dan. Med. Bull.* 37: 57-84, 1990.
97. LATTA, H. Filtration barriers in the glomerular capillary wall. In: *Functional ultrastructure of the kidney*, edited by A. B. Maunsbach, T. S. Olsen, and E. I. Christensen. London-New York-Toronto-Sydney-San Francisco: Academic Press, 1980, p. 3-28.
98. LEVEEN, H. H. Combination of evans blue with plasma protein: its significance in capillary permeability studies, blood dye disappearance curves, and its use as a protein tag. *Am. J. Physiol.* 151: 26-33, 1947.

99. LEVINE, S. A., M. MONTROSE, C. M. TSE, AND M. DONOWITZ. Kinetics and regulation of three cloned mammalian Na⁺/H⁺ exchangers stably expressed in a fibroblasts cell line. *J. Biol. Chem.* 268: 25527-25535, 1993.
100. LEVINE, S. A., S. K. NATH, J. W. YUN, M. MONTROSE, M. DONOWITZ, AND C. M. TSE. Separate C-terminal domains of the epithelial specific brush border Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE3 are involved in stimulation and inhibition by protein kinases/growth factors. *J. Biol. Chem.* 270: 13716-13725, 1995.
101. LINGREL, J. B., J. VAN HUYSSSE, W. O' BRIEN, E. JEWELL-MOTZ, R. ASKEW, AND P. SCHULTHEIS. Structure-function studies of the Na, K-ATPase. *Kidney Int. -suppl.* 44: S32-S39, 1994.
102. LONDOÑO, I., L. GHITESCU, AND M. BENDAYAN. Glomerular handling of circulating glycated albumin in the normal mouse kidney. *Am. J. Physiol.* 268: F913-F921, 1995.
103. LUNDSGAARD-HANSEN, P. Physiology and pathophysiology of colloid osmotic pressure and albumin metabolism. *Curr. Stud. Hematol. Blood Transf.* 53: 1-17, 1986.
104. MAACK, T. AND C. H. PARK. Endocytosis and lysosomal hydrolysis of proteins in proximal tubules. *Methods Enzymol.* 191: 340-354, 1990.
105. MAACK, T., C. H. PARK, AND M. J. F. CAMARGO. Renal filtration, transport and metabolism of proteins. In: *The Kidney: physiology and pathophysiology*, edited by D. W. Seldin and G. Giebisch. New York: Raven Press, 1985, p. 1773-1816.
106. MAHER, J. F. Tubular proteinuria. In: *Proteinuria*, edited by M. M. Avram. New York-London: Plenum Medical Book Company, 1985, p. 57-65.

107. MAJLOOR, C. L. H. Serum albumin in clinical practice: a historical review. In: *Clinical aspects of albumin*, edited by S. H. Yap, C. L. H. Majoor, and J. H. M. Van Tongeren. The Hague: Martinus Nijhoff Medical Division, 1978, p. 97-116.
108. MARSHANSKY, V., A. FLESER, J. NOËL, S. BOURGOIN, AND P. VINAY. Isolation of heavy endosomes from proximal tubules in suspension. *J. Membr. Biol.* 153: 59-73, 1996.
109. MAUNSBACH, A. B. Absorption of I¹²⁵-labeled homologous albumin by rat kidney proximal tubule cells. *J. Ultrastructure Research* 15: 197-241, 1966.
110. MAYORGA, L. S., R. DIAZ, AND P. D. STAHL. Reconstitution of endosomal proteolysis in a cell-free system. *J. Biol. Chem.* 264: 5392-5399, 1989.
111. MEYER, T. W. The proteinuric phase of diabetic nephrology. In: *Nephrology*, edited by M. Hatano. Tokyo: Springer-Verlag, 1991, p. 1351-1361.
112. MORAHAN, G., P. MCCLIVE, D. HUANG, P. LITTLE, AND A. BAXTER. Genetic and physiological association of diabetes susceptibility with raised Na⁺/H⁺ exchange activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91: 5898-5902, 1994.
113. MORITA, E., K. KAIZU, K. URIU, AND S. ETO. Clinical significance of urinary enzymes in diabetes mellitus. *Sangyo Ika Daigaku Zasshi* 12: 197-205, 1990.
114. MRKIC, B., C. M. TSE, J. FORGO, C. HELMLE-KOLB, M. DONOWITZ, AND H. MURER. Identification of PTH-responsive Na/H exchanger isoforms in a rabbit proximal tubule cell line (RKPC-2). *Eur. J. Physiol.* 424: 377-384, 1993.
115. MULEC, H., S. A. JOHNSEN, AND S. BJÖRCK. Long-term enalapril treatment in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 45: 141-144, 1994.

116. MYERS, B. D. In vivo evaluation of glomerular permselectivity in normal and nephrotic man. In: *Proteinuria*, edited by M. M. Avram. New York-London: Plenum Medical Book Company, 1985, p. 17-35.
117. NATH, S. K., C. Y. HANG, S. A. LEVINE, C. H. YUN, M. H. MONTROSE, M. DONOWITZ, AND C. M. TSE. Hyperosmolarity inhibits the Na^+/H^+ exchanger isoforms NHE2 and NHE3: an effect opposite to that on NHE1. *Am. J. Physiol.* 270: G431-G441, 1996.
118. NELSON, N. Structure and pharmacology of the proton-ATPases. *TiPS* 12: 71-75, 1991.
119. NELSON, N. AND L. TAIZ. The evolution of H^+ -ATPases. *TIBS* 14: 113-116, 1989.
120. NOËL, J. AND J. POUYSSÉGUR. Hormonal regulation, pharmacology and membrane sorting of vertebrate Na^+/H^+ exchanger isoforms. *Am. J. Physiol.* 37: C283-C296, 1995.
121. OLBRICHT, C. J. Distribution of cathepsins B and L in the kidney and their role in tubular protein absorption. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 30: 675-681, 1992.
122. OLBRICHT, C. J. AND B. GEISSINGER. Renal hypertrophy in streptozotocin diabetic rats: role of proteolytic lysosomal enzymes. *Kidney Int.* 41: 966-972, 1992.
123. ORATZ, M., M. A. ROTHSCHILD, AND S. S. SCHREIBER. Regulation of albumin synthesis. In: *Clinical aspects of albumin*, edited by S. H. Yap, C. L. H. Majoor, and J. H. M. Van Tongeren. The Hague: Martinus Nijhoff Medical Division, 1978, p. 67-80.

124. OSTERBY, R., H. J. G. GUNDERSEN, J. P. KROUSTRUP, C. E. MOGENSEN, AND K. SEYER-HANSEN. Enlargement of the glomerular capillary surface and increased glomerular function in early diabetes. In: *Functional ultrastructure of the kidney*, edited by A. B. Maunsbach, T. S. Olsen, and E. I. Christensen. London-New York-Toronto-Sydney-San Francisco: Academic Press, 1980, p. 143-149.
125. PARK, C. H. Time course and vectorial nature of albumin metabolism in isolated perfused rabbit PCT. *Am. J. Physiol.* 255: F520-F528, 1988.
126. PARK, C. H., M. J. F. CAMARGO, AND T. MAACK. Tubular handling of proteins. Absorption of albumin by isolated perfused proximal convoluted tubules of the rabbit. In: *Proteinuria*, edited by M. M. Avram. New York-London: Plenum Medical Book Company, 1985, p. 37-56.
127. PARK, C. H. AND T. MAACK. Albumin absorption and catabolism by isolated perfused proximal convoluted tubules of the rabbit. *J. Clin. Invest.* 73: 767-777, 1984.
128. PEDERSEN, P. L. AND E. CARAFOLI. Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *TIBS* 12: 146-150, 1987.
129. PETERS, T. Serum albumin. *Advances in protein chemistry* 37: 161-245, 1985.
130. PINTER, G. G., P. D. WILSON, D. R. BELL, J. L. ATKINS, AND J. E. STORK. Interstitial albumin pool in the renal cortex: its turnover and the permeability of peritubular capillaries. In: *Functional ultrastructure of the kidney*, edited by A. B. Maunsbach, T. S. Olsen, and E. I. Christensen. London-New York-Toronto-Sydney-San Francisco: Academic Press, 1980, p. 411-422.
131. RAWSON, R. A. The binding of T-1824 and structurally related diazo dyes by the plasma proteins. *Am. J. Physiol.* 138: 708-717, 1943.

132. REDDI, A. S. Prevention of albuminuria by captopril in diabetic rats. *Gen. Pharmac.* 22: 323-328, 1991.
133. ROCHU, D. L'albumine humaine. Structures, synthèse et fonctions. *Rev. Fr. Transfus. Immunol. Hematol.* XXIX: 13-33, 1986.
134. RODMAN, J. S., P. D. STAHL, AND S. GLUCK. Distribution and structure of the vacuolar H⁺ ATPase in endosomes and lysosomes from LLC-PK1 cells. *Exp. Cell Res.* 192: 445-452, 1991.
135. ROSSIER, B. C., K. GEERING, AND J. P. KRAEHENBUHL. Regulation of the sodium pump: how and why?. *TIBS* 12: 483-487, 1987.
136. ROTHSCHILD, M. A., M. ORATZ, AND S. S. SCHREIBER. Short-term measurements of serum protein synthesis. In: *Physiology and pathophysiology of plasma protein metabolism*, edited by G. Birke, R. Norberg, and L. O. Plantin. Oxford-London-Edinburgh-New York-Toronto-Sydney-Paris-Braunschweig: Pergamon Press, 1969, p. 53-59.
137. RUBIO, C. R., O. C. MANGILI, G. B. DE MELLO, AND G. MALNIC. Effect of temperature on proximal tubular acidification. *Eur. J. Physiol.* 393: 71-76, 1982.
138. SCHERBERICH, J. E. Urinary proteins of tubular origin: basic immunochemical and clinical aspects. *Am. J. Nephrol.* 10: 43-51, 1990.
139. SCHILD, L., P. S. ARONSON, AND G. GIEBISCH. Effects of apical membrane Cl(-)-formate exchange on cell volume in rabbit proximal tubule. *Am. J. Physiol.* 258: F530-F536, 1990.

140. SCHMID, A., G. BURCKHARDT, AND H. GÖGELEIN. Single chloride channels in endosomal vesicle preparations from rat kidney cortex. *J. Membr. Biol.* 111: 265-275, 1989.
141. SCHWEGLER, J. S., B. HEPPELMANN, S. MILDENBERGER, AND S. SILBERNAGL. Receptor-mediated endocytosis of albumin in cultured opossum kidney cells: a model for proximal tubular protein reabsorption. *Eur. J. Physiol.* 418: 383-392, 1991.
142. SCHWIEBERT, E. M., T. FLOTTE, G. R. CUTTING, AND W. B. GUGGINO. Both CFTR and outwardly rectifying chloride channels contribute to cAMP-stimulated whole cell chloride currents. *Am. J. Physiol.* 266: C1464-C1477, 1994.
143. SENSI, M., P. TANZI, M. R. BRUNO, P. POZZILI, M. MANCUSO, S. GAMBARDELLA, AND U. DI MARIO. Electrical charge of serum and urinary albumin in normal and diabetic humans. *Kidney Int.* 28: 168-177, 1985.
144. SHAFRITZ, D. A., R. K. STAIR, AND S. H. YAP. Molecular approach to the study of albumin synthesis. In: *Clinical aspects of albumin*, edited by S. H. Yap, C. L. H. Majoor, and J. H. M. Van Tongeren. The Hague: Martinus Nijhoff Medical Division, 1978, p. 25-46.
145. SILVER, A. C., E. LAMB, W. R. CATTEL, AND A. B. DAWNAY. Investigation and validation of the affinity chromatography method for measuring glycated albumin in serum and in urine. *Clin. Chim. Acta* 202: 11-22, 1991.
146. SIMON, F. R., H. L. LEFFERT, M. ELLISMAN, M. IWAHASHI, T. DEERINCK, J. FORTUNE, D. MORALES, R. DAHL, AND E. SUTHERLAND. Hepatic Na⁺-K⁺ ATPase enzyme activity correlates with polarized b-subunit expression. *Am. J. Physiol.* 269: C69-C84, 1995.

147. SKRHA, J., M. SPERL, P. STOLBA, J. HILGERTOVA, AND V. STIBOR. Albuminuria and N-acetyl-beta-glucosaminidase activity in a prospective study of type I diabetics. *Vnitřní Lekarství* 39: 699-705, 1993.
148. SMITH, P. R., G. SACCOMANI, E. H. JOE, K. J. ANGELIDES, AND D. J. BENOS. Amiloride-sensitive sodium channel is linked to the cytoskeleton in renal epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 6971-6975, 1991.
149. SOLEIMANI, M., C. BOOKSTEIN, J. A. MCATEER, Y. J. HATTABAUGH, G. L. BIZAL, M. W. MUSCH, M. VILLEREAL, M. C. RAO, R. L. HOWARD, AND E. B. CHANG. Effect of high osmolality on Na^+/H^+ exchange in renal proximal tubule cells. *J. Biol. Chem.* 269: 15613-15618, 1994.
150. STEPUROVO, I. I., A. A. SOLODUNOV, AND N. V. IAROHEVICH. Bilirubin binding to glycosylated human serum albumin. *Vopr. Med. Khim.* 32: 46-48, 1986.
151. STONE, D. K., B. P. CRIDER, AND X-S XIE. Structural properties of vacuolar proton pumps. *Kidney Int.* 38: 649-653, 1990.
152. STONE, D. K., B. P. CRIDER, AND X. S. XIE. Structure of vacuolar proton pumps. *Semin. Nephrol.* 10: 159-165, 1990.
153. TSE, C. M., S. A. LEVINE, C. YUN, S. R. BRANT, J. POUYSSÉGUR, M. H. MONTROSE, AND M. DONOWITZ. Functional characteristics of a cloned epithelial Na^+/H^+ exchanger (NHE3): resistance to amiloride and inhibition by protein kinase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90: 9110-9114, 1993.
154. TSE, M., S. LEVINE, C. YUN, S. BRANT, L. T. COUNILLON, AND J. POUYSSÉGUR. Structure/function studies of the epithelial isoforms of the mammalian Na^+/H^+ exchanger gene family. *J. Membr. Biol.* 135: 93-108, 1993.

155. ULLRICH, K. J., G. CAPASSO, G. RUMRICH, F. PAPAVALASSILIOU, AND S. KLÖSS. Coupling between proximal tubular transport processes. *Eur. J. Physiol.* 368: 245-252, 1977.
156. VAN DYKE, R. W. Na^+/H^+ exchange modulates acidification of early rat liver endocytic vesicles. *Am. J. Physiol.* 269: C943-C954, 1995.
157. VAN TONGEREN, J. H. M., O. J. J. CLUYSENAER, C. B. H. LAMERS, P. H. M. DE MULDER, AND S. H. YAP. Causes of hypoalbuminemia. In: *Clinical aspects of albumin*, edited by S. H. Yap, C. L. H. Majoor, and J. H. M. Van Tongeren. The Hague: Martinus Nijhoff Medical Division, 1978, p. 117-133.
158. VENGLARIK, C. J., A. K. SINGH, AND R. J. BRIDGES. Comparison of -nitro versus -amino 4, 4'-substituents of disulfonic stilbenes as chloride channel blockers. *Mol. Cell. Biochem.* 140: 137-146, 1994.
159. WAKABAYASHI, S., B. BERTRAND, T. IKEDA, J. POUYSSÉGUR, AND M. SHIGEKAWA. Mutation of calmodulin-binding site renders the Na^+/H^+ exchanger (NHE1) highly H^+ -sensitive and Ca^{2+} regulation-defective. *J. Biol. Chem.* 269: 13710-13715, 1994.
160. WAKABAYASHI, S., B. BERTRAND, M. SHIGEKAWA, P. FAFOURNOUX, AND J. POUYSSÉGUR. Growth factor activation and " H^+ sensing" of the Na^+/H^+ exchanger isoform 1 (NHE1). Evidence for an additional mechanism not requiring direct phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 269: 5583-5588, 1994.
161. WAKABAYASHI, S., C. SARDET, P. FAFOURNOUX, AND J. POUYSSÉGUR. The Na^+/H^+ antiporter cytoplasmic domain mediates growth factors signals and controls " H^+ sensing". *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89: 2424-2428, 1992.

162. WALKER, J. D. Implications of microalbuminuria in diabetes. *Br. J. Hosp. Med.* 45: 41-44, 1991.
163. WALL, D. A. AND T. MAACK. Endocytic uptake, transport and catabolism of proteins by epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 248: C12-C20, 1985.
164. WEINMAM, E. J. AND S. SHENOLIKAR. Regulation of the renal brush border membrane $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchanger. *Annual Rev. Physiol.* 55: 289-304, 1993.
165. WERNER, G., H. HAGENMAIER, H. DRAUTZ, A. BAUMGARTNER, AND H. ZÄHNER. Metabolic products of microorganisms. Bafilomycins, a new group of macrolide antibiotics. Production, isolation, chemical structure and biological activity. *J. Antibiotics* 37: 110-117, 1984.
166. WILDE, W. S., S. J. LEGAN, AND A. K. SOUTHWICK. Reabsorption of albumin-Evans blue via membrane vesicles of proximal kidney tubule cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 127: 776-781, 1968.
167. WILLIAMSON, J. R. AND C. KILO. Basement membrane in diabetes mellitus. In: *Complications of diabetes mellitus*, edited by B. Draznin, S. Melmed, and D. Leroith. New York: Alan R. Liss, 1989, p. 19-29.
168. WOLF, G. Angiotensin as a renal growth promoting factor. *Adv. Exp. Med. & Biol.* 377: 225-236, 1995.
169. YOSHIMORI, T., A. YAMAMOTO, Y. MORIYAMA, M. FUTAI, AND Y. TASHIRO. Bafilomycin A₁, a specific inhibitor of vacuolar-type $\text{H}^+\text{-ATPase}$, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J. Biol. Chem.* 266: 17707-17712, 1991.

170. YUN, C. H., C. M. TSE, S. K. NATH, S. A. LEVINE, S. R. BRANT, AND M. DONOWITZ. Mammalian Na^+/H^+ exchanger gene family: structure and function studies. *Am. J. Physiol.* 269: G1-G11, 1995.
171. ZIYADEH, F. N., S. GOLDFARB, AND E. F. O. KERN. Diabetic nephropathy: metabolic and biochemical mechanisms. In: *The kidney in diabetes mellitus*, edited by B. M. Brenner and J. H. Stein. New York-Edinburgh-London-Melbourne: Churchill Livingstone, 1994, p. 87-113.