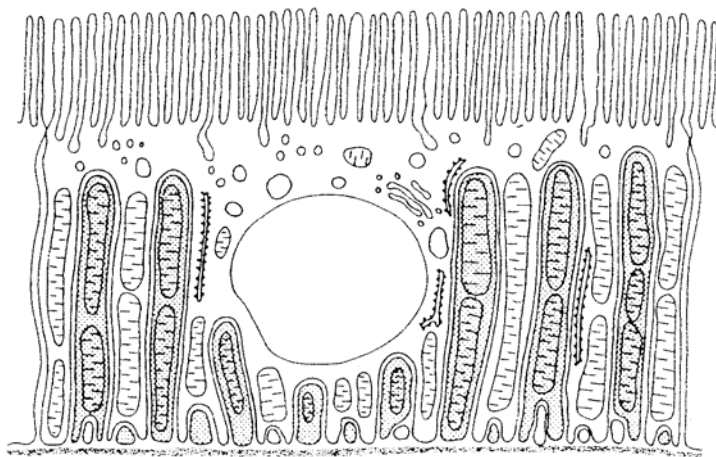


PHYSIO - UNITE D'ENSEIGNEMENT n°10

2005/2006

PHYSIOLOGIE DE LA CELLULE RENALE



Philippe POUJEOL
UMR CNRS 6548

Mars 2006

PLAN

I)- ORGANISATION CELLULAIRE DU NEPHRON

1)-Anatomie schématique

2)-Morphologie : principales caractéristiques.

- Tubule proximal
- Anse de Henle
- Tubule distal
- Canaux collecteurs

3)- Méthodes d'études

- Au niveau tubulaire: *microponctions, microinjections, microperfusions*
- Au niveau cellulaire: *cellules isolées, cultures primaires, lignées cellulaires.*
- Au niveau membranaire : *vésicules membranaires.*

II)- GENERALITES SUR LES DIFFERENTS MECANISMES DE TRANSPORT

1)- Composition des compartiments liquidiens de l'organisme

2)- Protéines de transport

3)- Notion de force motrice

4)- Potentiel d'équilibre. Loi de Nernst

III)- PHYSIOLOGIE DE LA CELLULE PROXIMALE

1)- Rôle des domaines membranaires dans les phénomènes de transport

2) Transport de glucose.

3)- Transport des acides aminés

4)- Transport des protéines

5)- Transport des phosphates

6)- Transport des anions organiques

7)- Régulation du pH (*antiports Na^+/H^+ et Cl^-/HCO_3^-*)

8)- Sécrétion

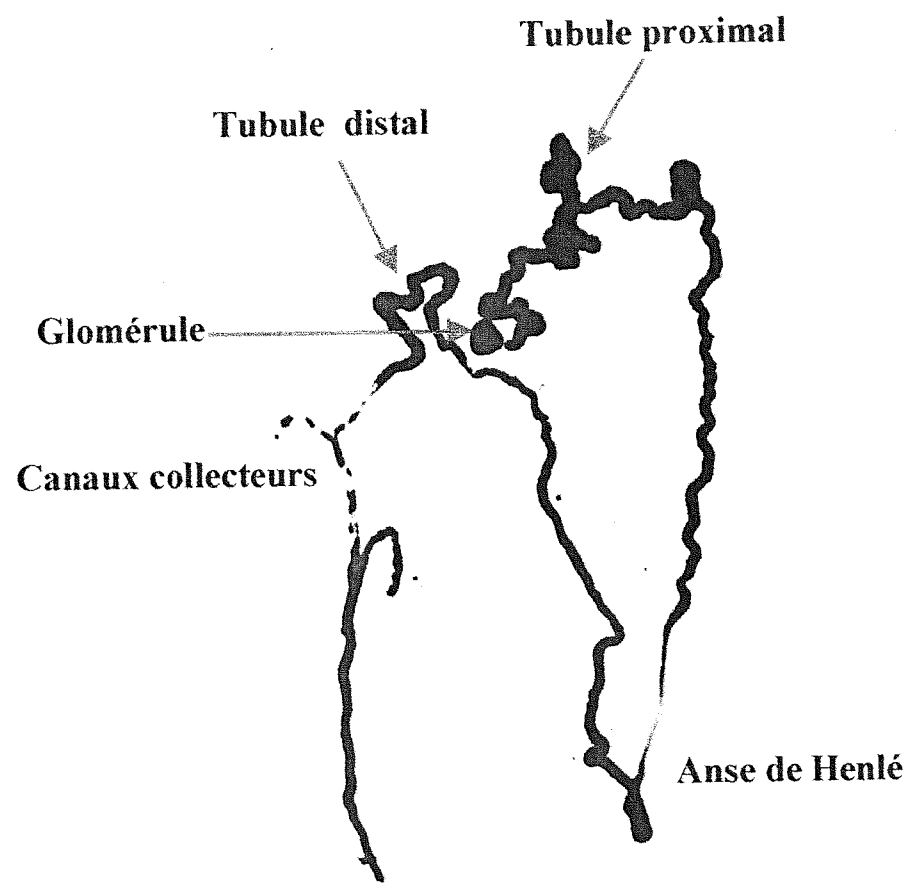
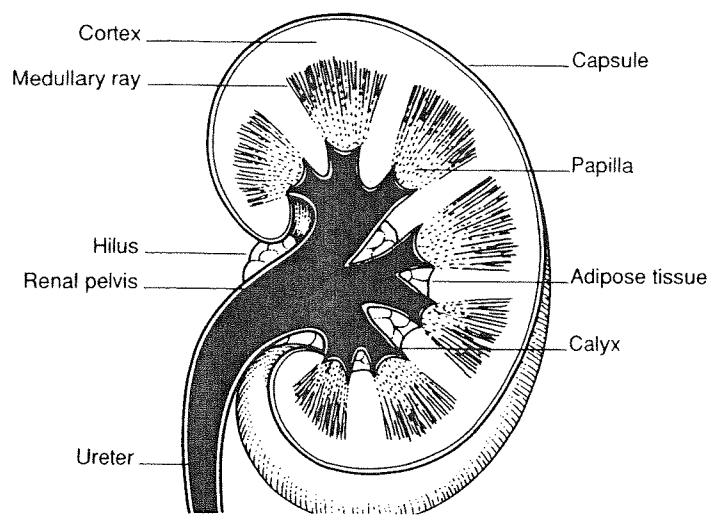
IV)- PHYSIOLOGIE DE LA CELLULE DE L'ANSE DE HENLE

- 1)- Cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$**

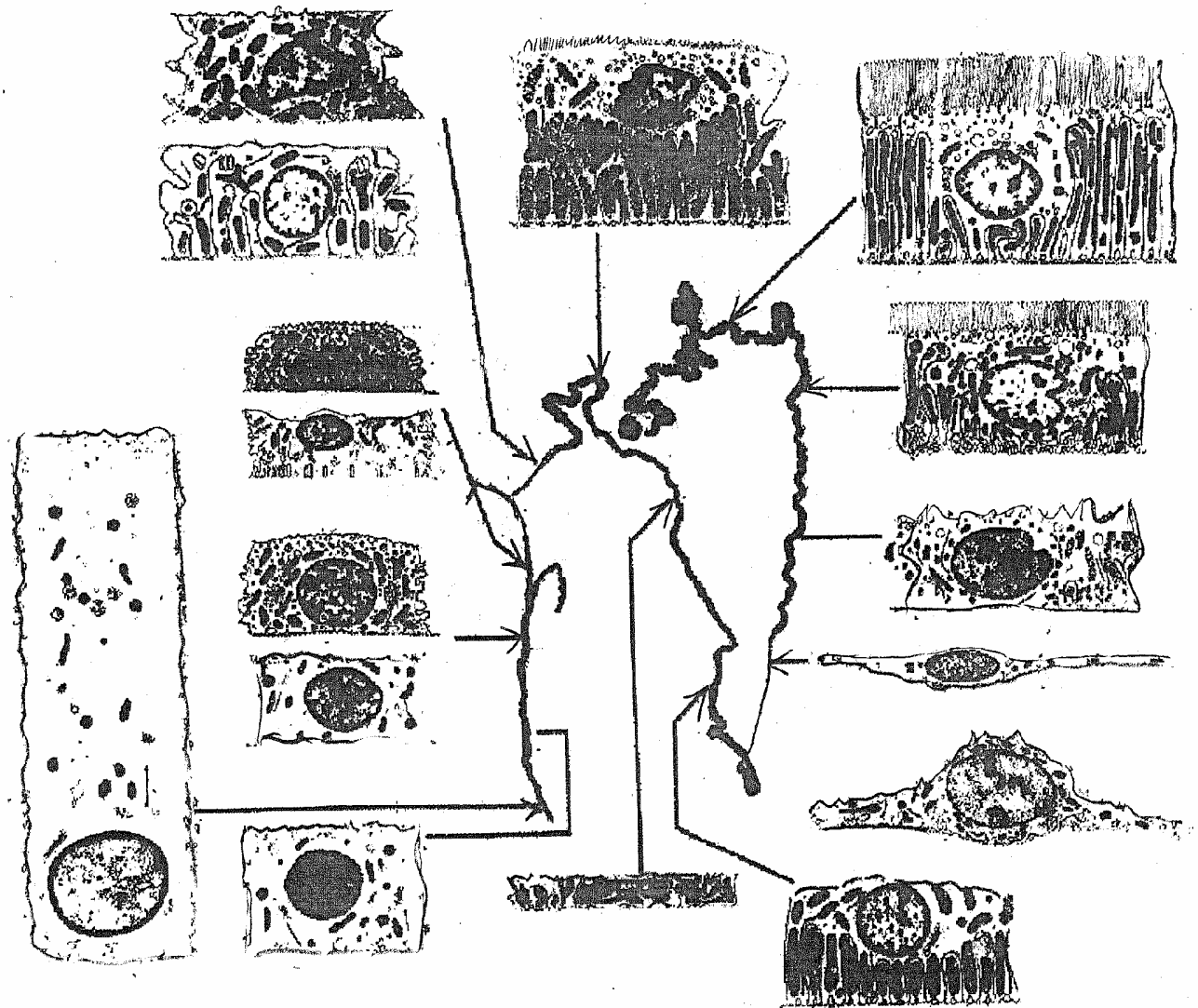
V)- PHYSIOLOGIE DES CELLULES DISTALES ET DU CANAL COLLECTEUR

- 1) Transport de Na^+**
- 2)- Transport de K^+**
- 3)- Transport de Cl^-**
- 4)- Régulation du pH**
- 5)- Transport de Ca^{++}**
- 6) Régulation du transport d'eau**

ORGANISATION CELLULAIRE DU NEPHRON

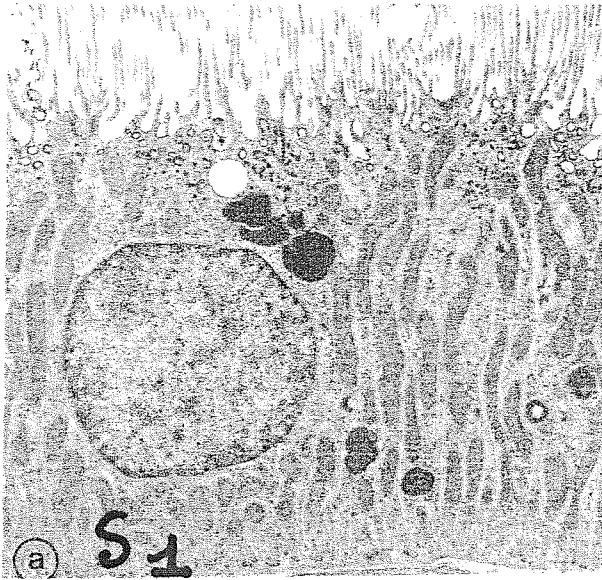


~ ANATOMIE SCHEMATIQUE DU NEPHRON ~

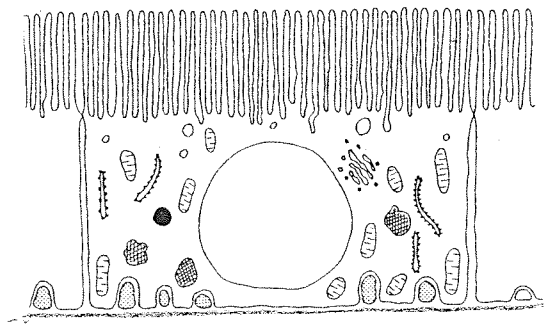
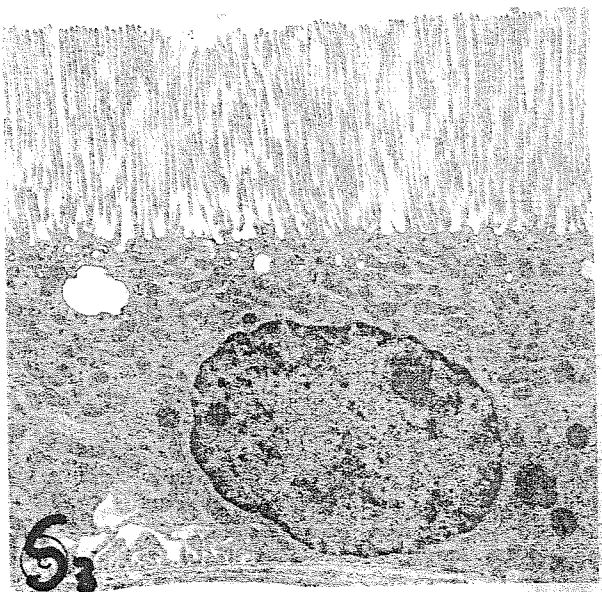
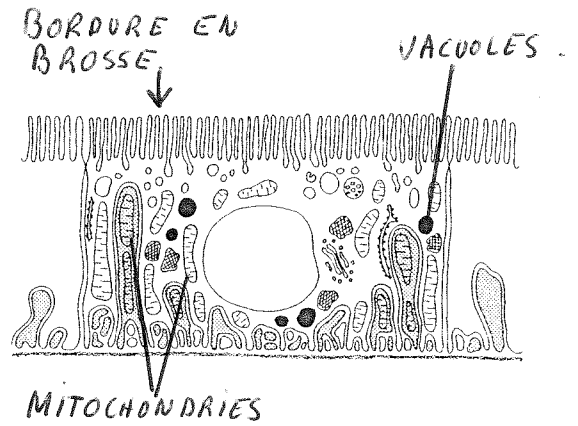
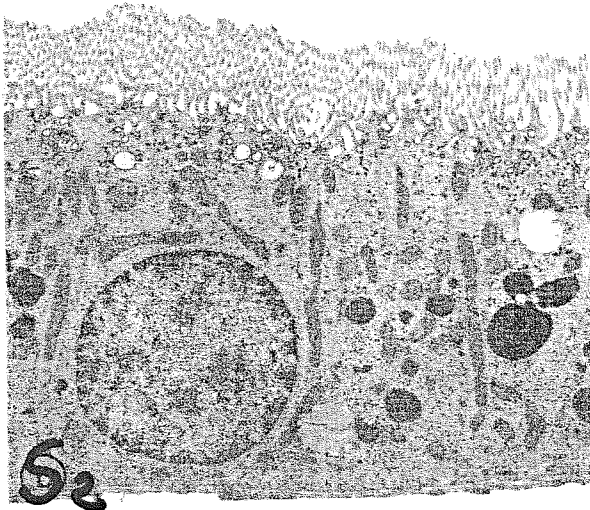
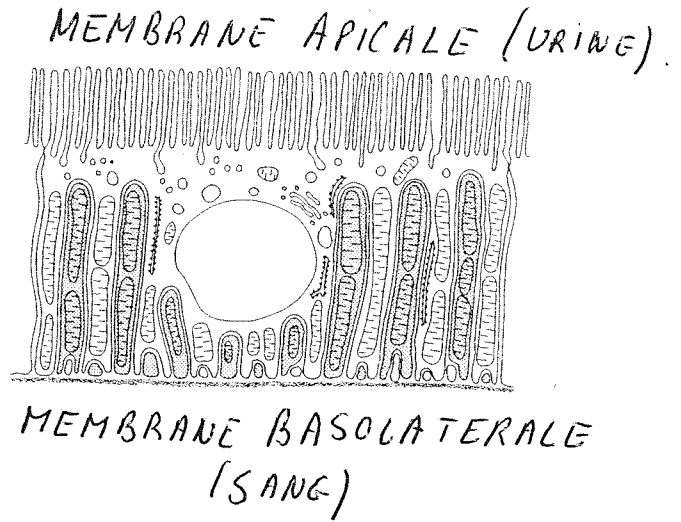


ILLUSTRATIONS OF DIFFERENT CELL TYPES FROM B. KAISSLING AND N. KRIZ

TUBULE PROXIMAL (Rat) 6

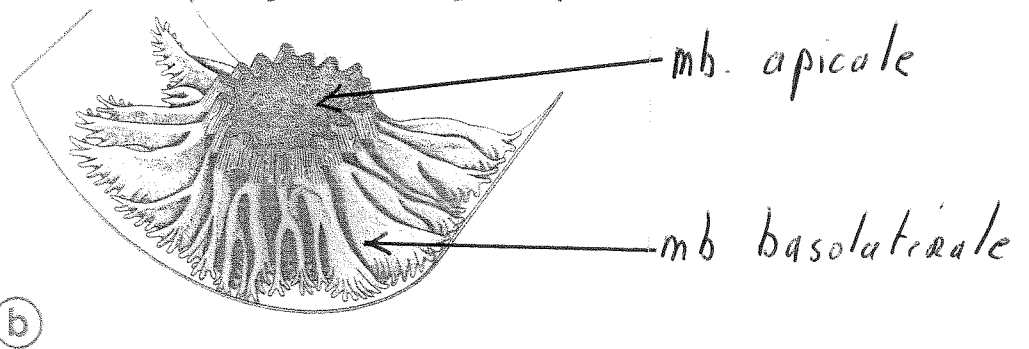
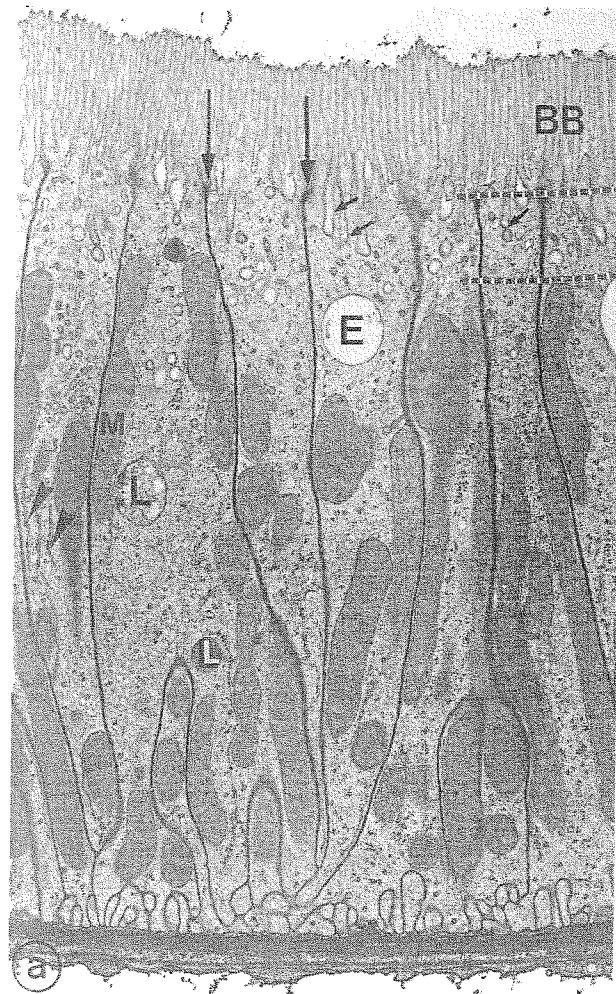


x 5400.



MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

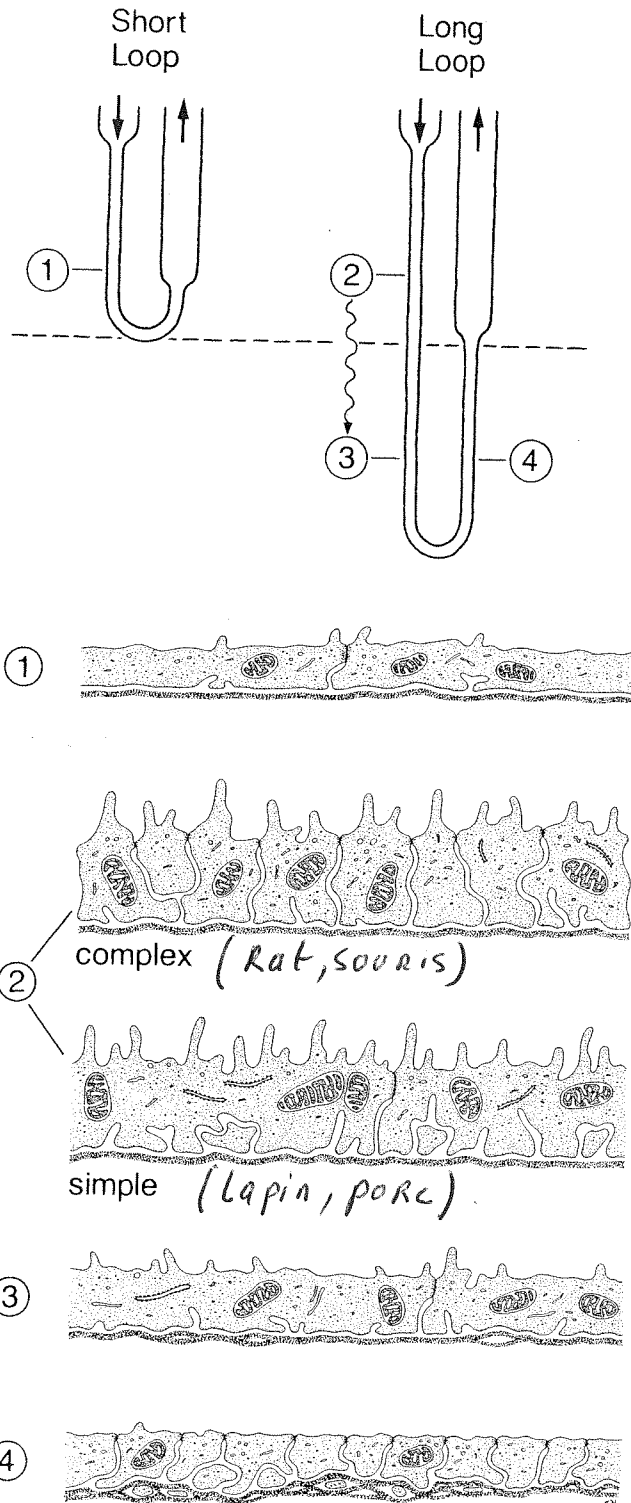
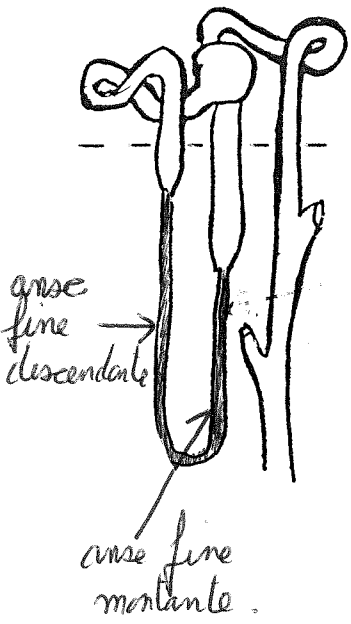
ORGANISATION D'UNE CELLULE PROXIMALE⁷



(a) : Coupe d'une cellule proximale au niveau S₂.
B.B = Bordure en brosse.
E = Endosomes. L : Lysosomes.

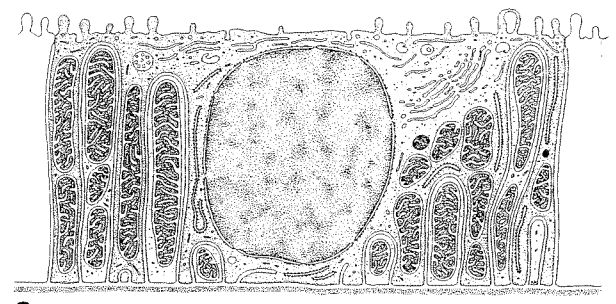
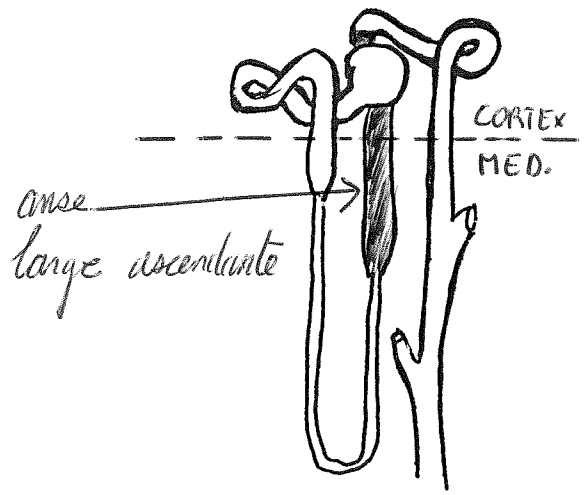
(b) : Reconstitution en 3 dimensions.
Noter l'organisation de la membrane baso latérale.

. ANSE DE HENLE (PARTIE FINE).

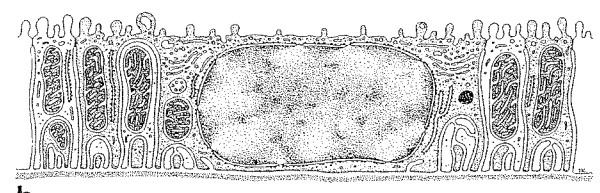


- ① Anses courtes
- ② Anses longues: Les Cellules peuvent ici, être différentes selon l'espèce.

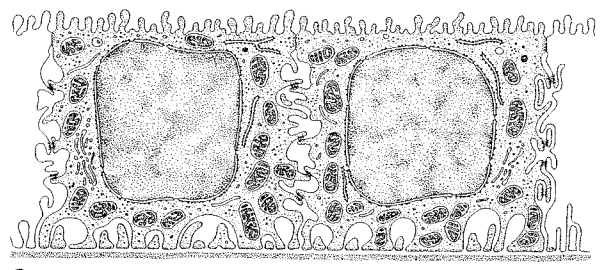
- ANSE DE HENLE (PARTIE ÉPAISSE) -



a



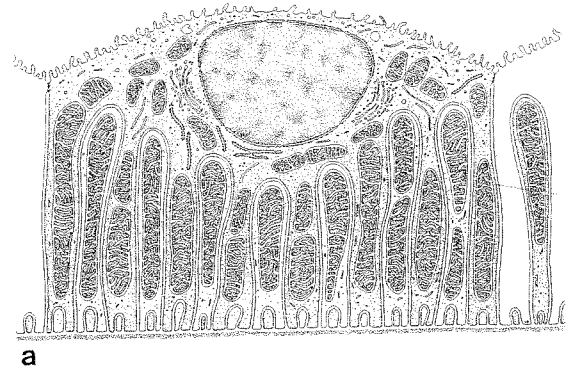
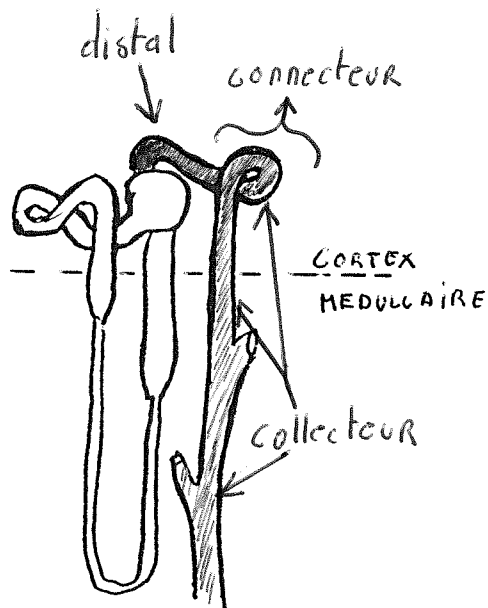
b



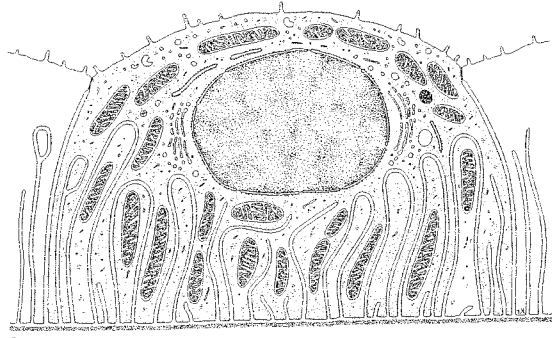
c

- (a) partie médullaire.
- (b) partie corticale.
- (c) macula densa.

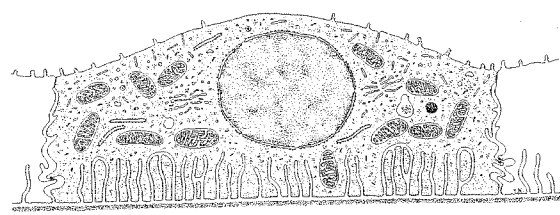
SEGMENTS TERMINAUX DU NÉPHRON.



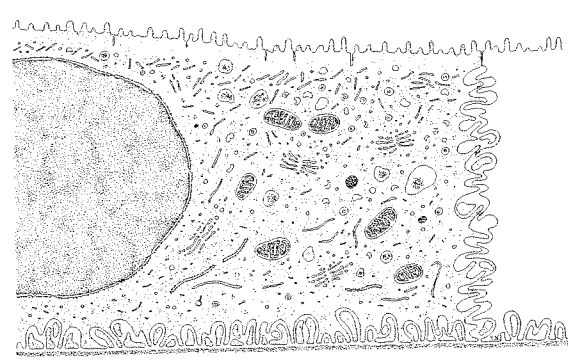
a



b



c

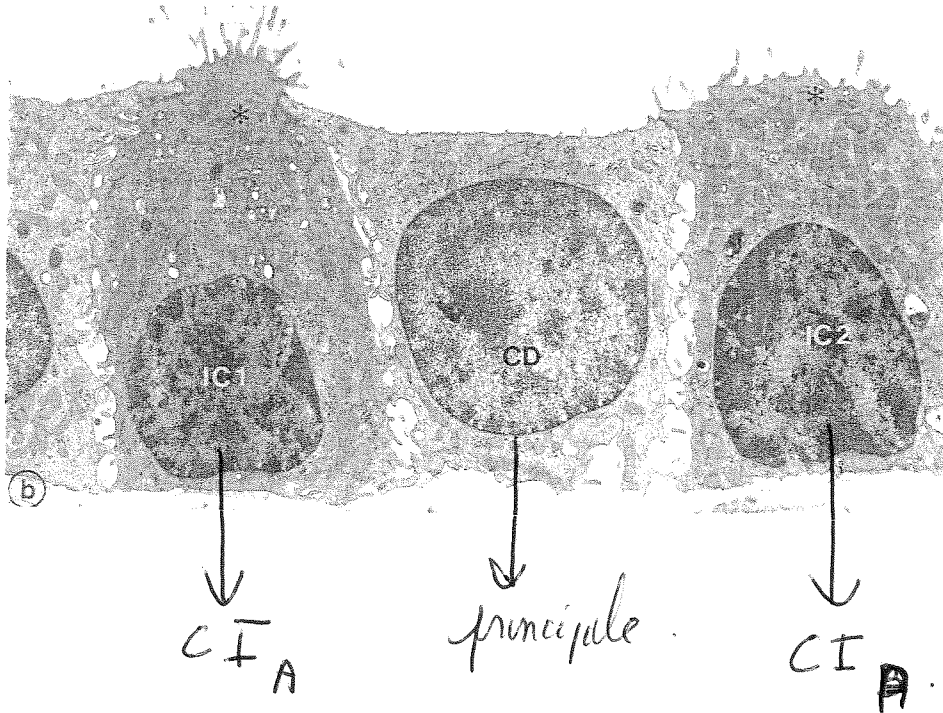
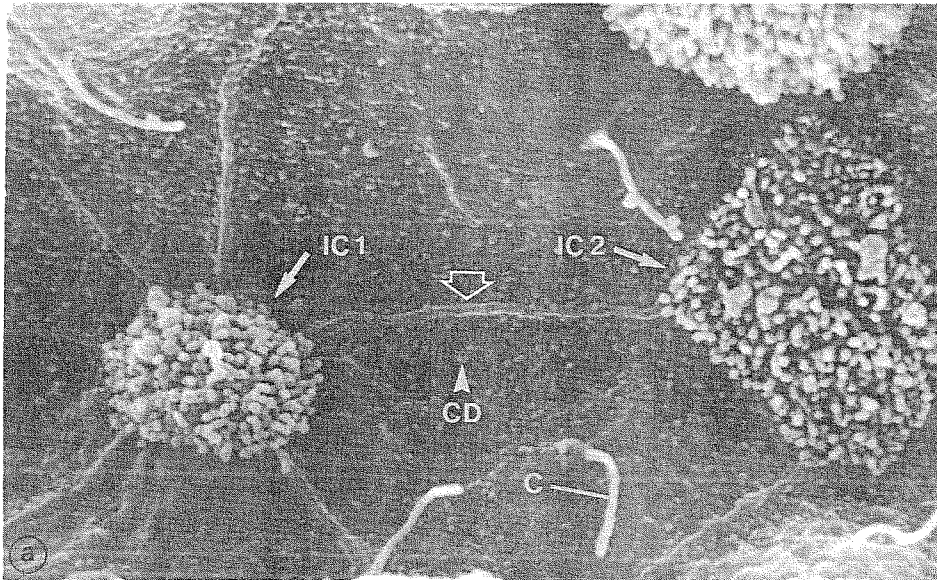
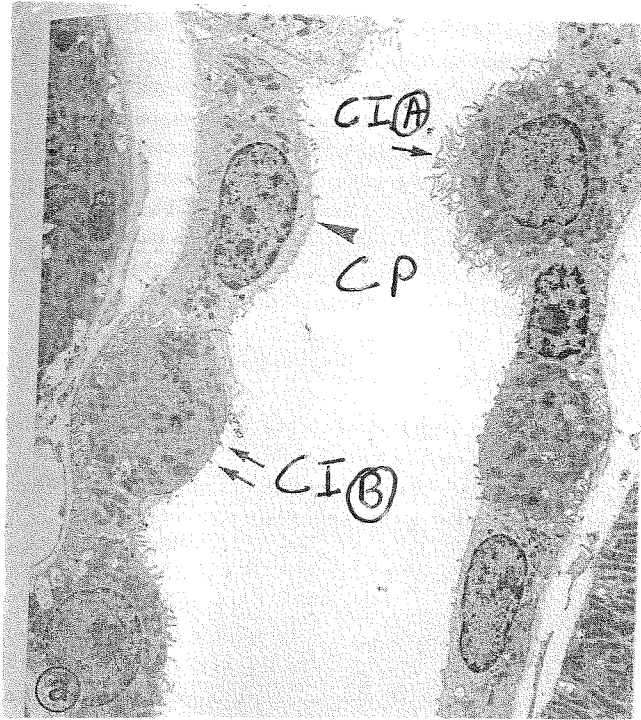


d

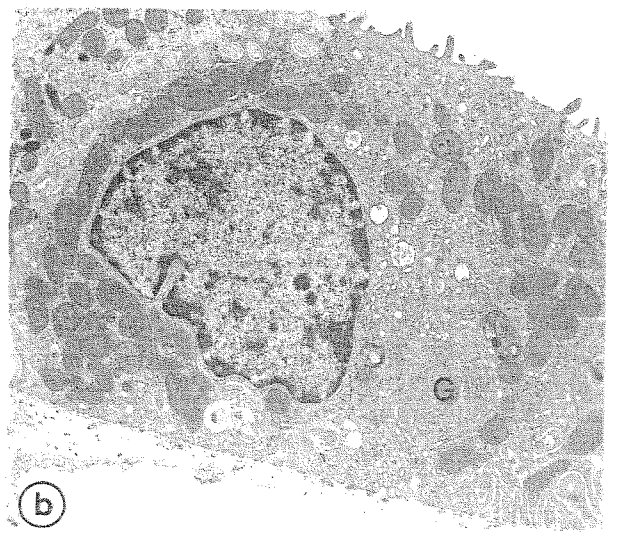
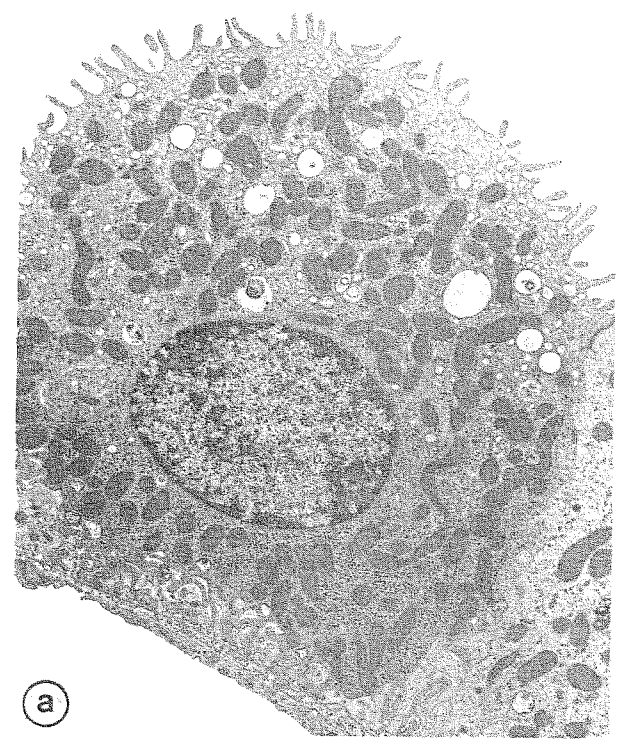
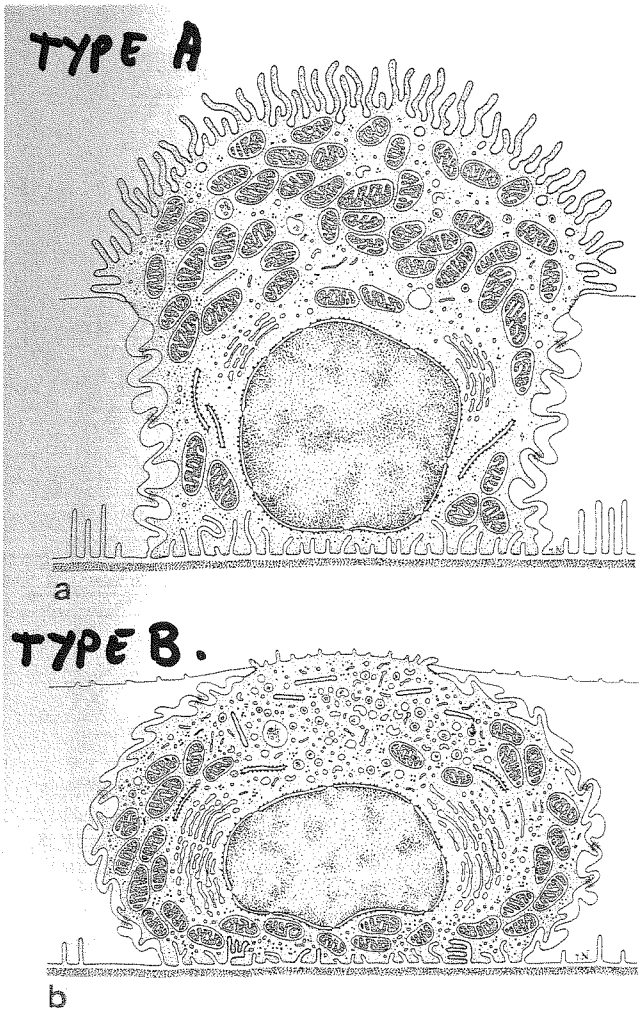
- (a) : Tubule contourné distal.
- (b) : Tubule connecteur (cellule CNT).
- (c) : Tubule collecteur (cellule principale) cortical.
- (d) : Tubule collecteur médullaire (cellule IMCD).

- CANAUX COLLECTEURS -

CI_A = Cellule intercalaire
 de type A
CI_B = Cellule intercalaire
 de type B
CP = Cellule principale



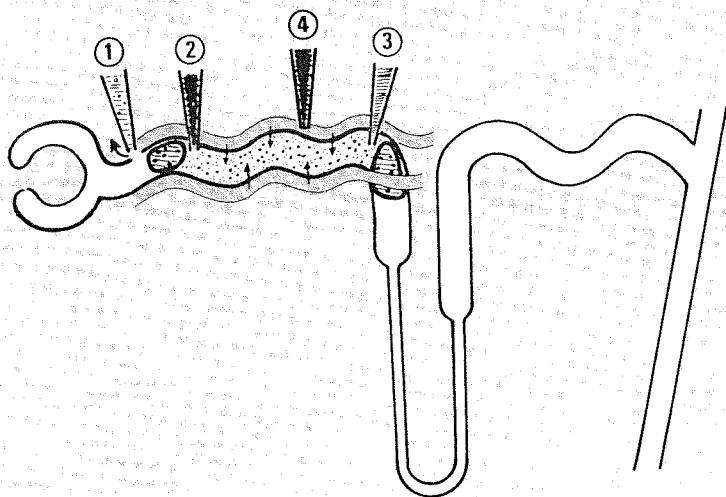
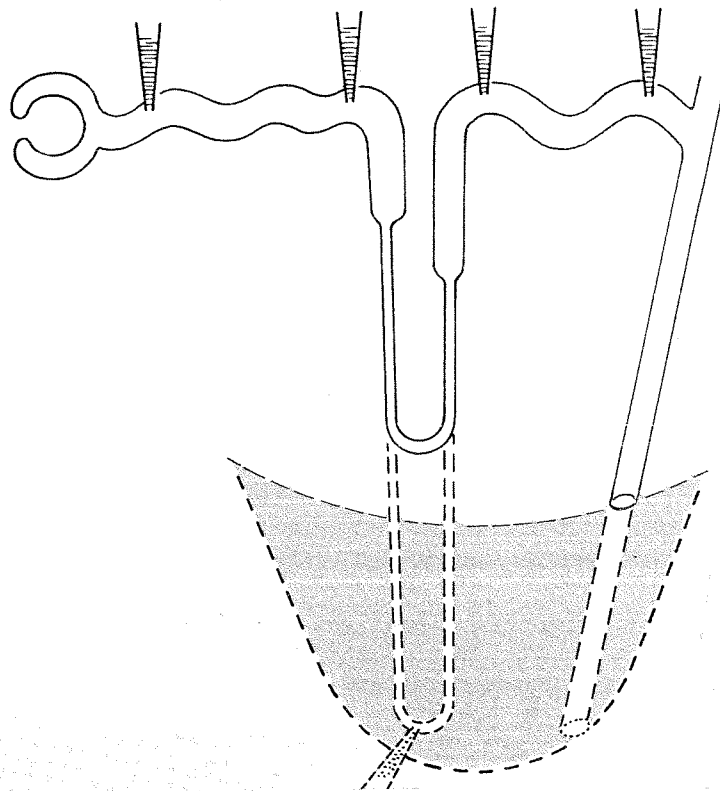
LES CELLOLES INTERCALAIRES.



Les cellules de types A présentent une forte quantité de H^+ ATPase dans la membrane apicale.

ETUDE DES FONCTIONS TUBULAIRES

MICROPONCTIONS
OU
MICRO INJECTIONS →

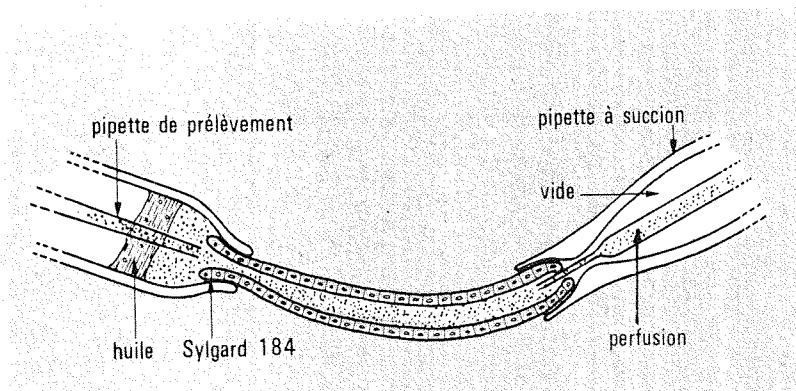


MICROPERFUSION
IN SITU ←

12.13 Microperfusion du tubule associée à une microperfusion du réseau capillaire péri-tubulaire.

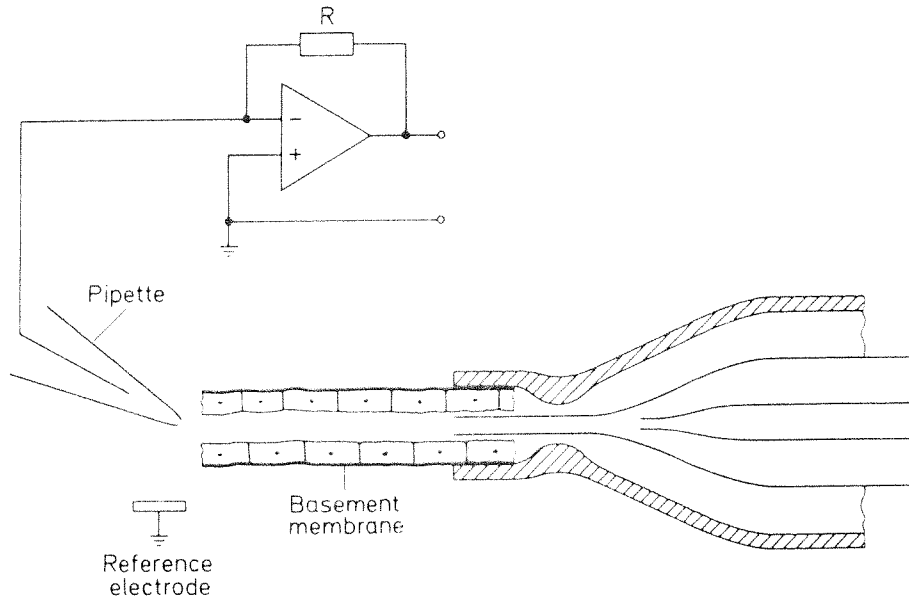
- 1 Pipette ayant introduit l'huile et dont l'orifice permet l'écoulement du filtrat.
- 2 Pipette de perfusion du tube.
- 3 Pipette de recollection.
- 4 Pipette de perfusion du réseau capillaire.

MICROPERFUSION
IN VITRO →

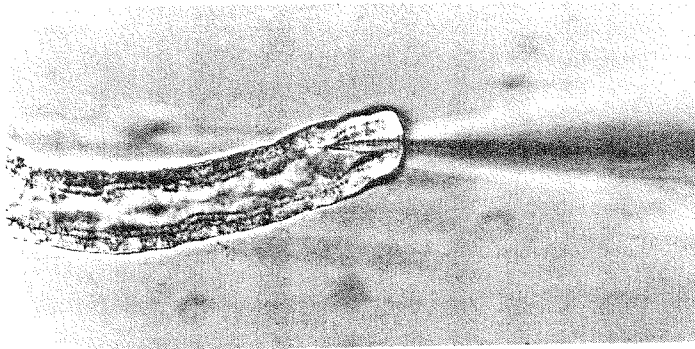


12.15 Montage d'un segment tubulaire en microperfusion.

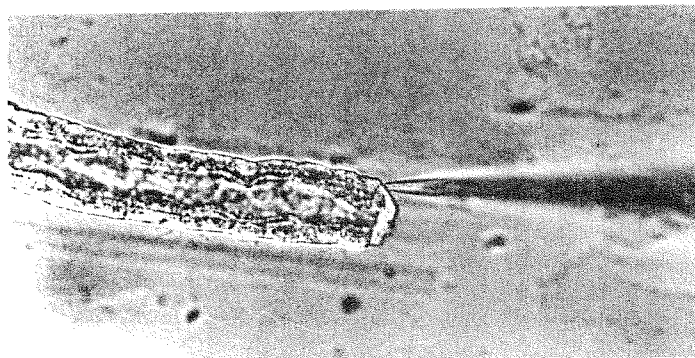
L'extrémité des pipettes et le tube sont plongés dans un milieu d'incubation. Le capillaire de prélèvement est déplacé sous la couche d'huile lorsqu'un recueil de liquide doit être effectué.



a



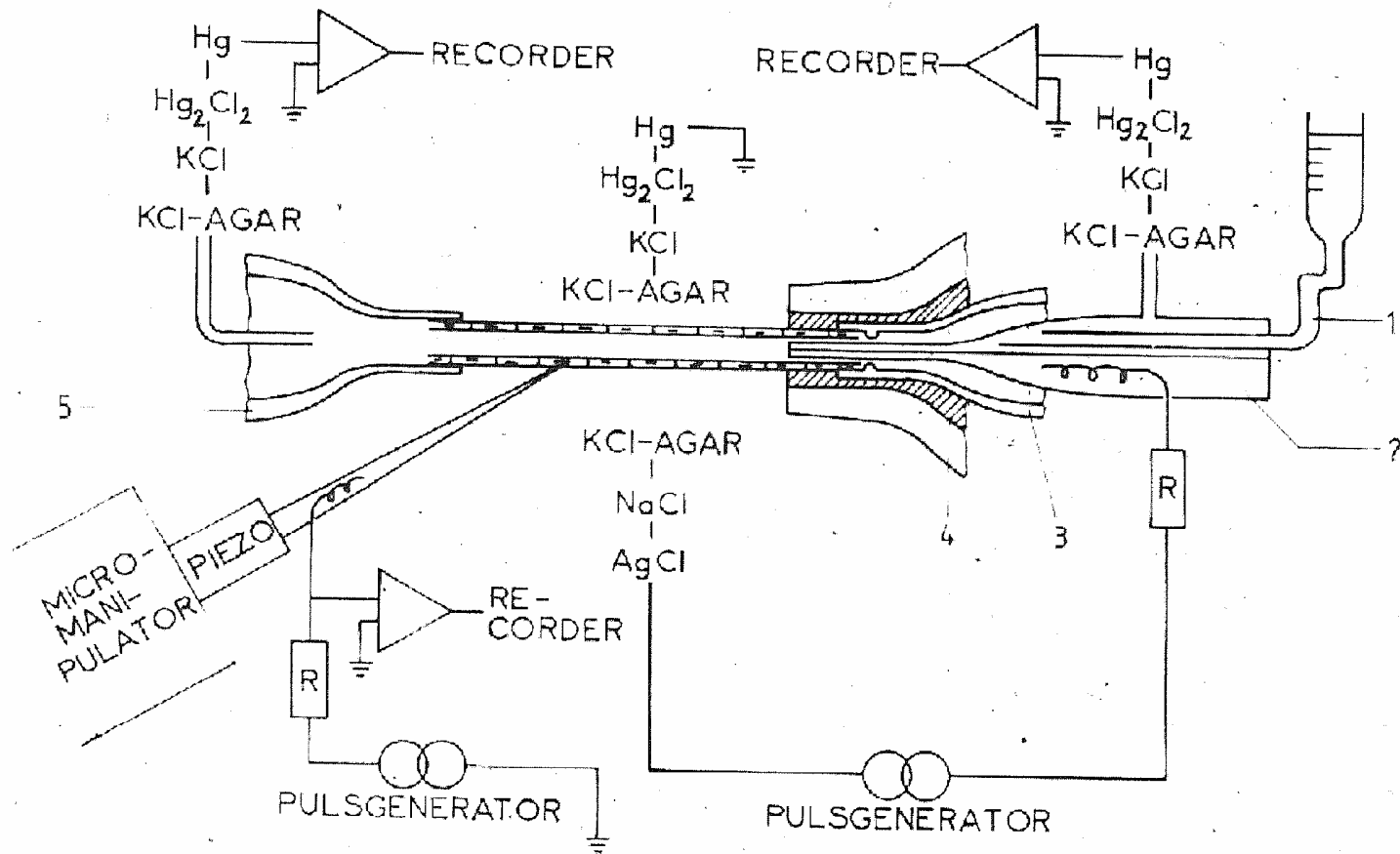
b



c

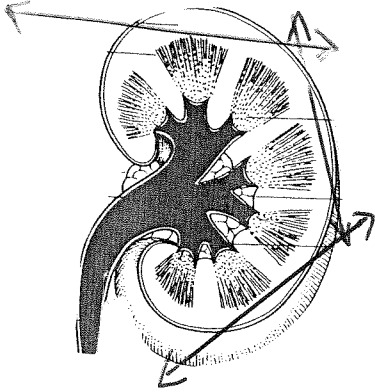
d'après GOGELIN
et GREGER
Pflügers 1984

MICROPERFUSION IN VITRO ET MESURES ELECTROPHYSIOLOGIQUES.



CULTURE PRIMAIRE DE CELLULES RÉNALES

I)- A PARTIR DE CELLULES ISOLÉES MÉCANIQUEMENT (PRINCIPALEMENT CELLULES PROXIMALES).



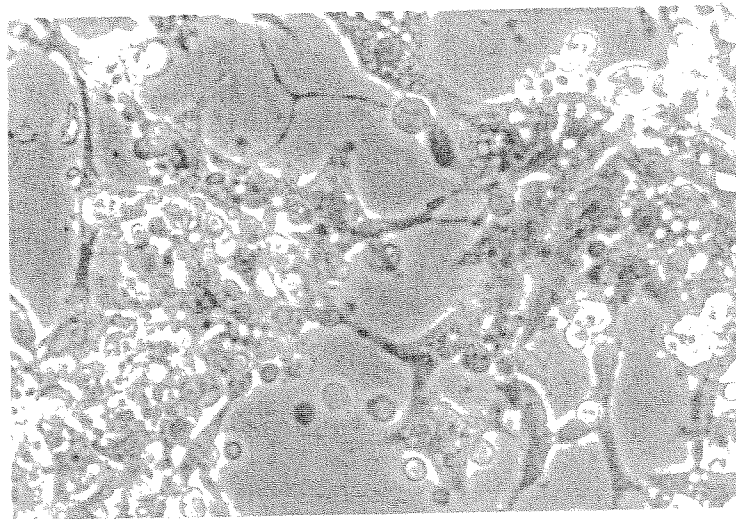
- Tranches de cortex
- Broyage dans une presse
- Tamisage sur des tamis de mailles calibrées (100 μ m, 40 μ m et 20 μ m) avec centrifugation.
- A la fin le culot est remis en suspension et les cellules sont ensemencées sur différents supports enduits de collagène

Avantages: technique rapide et simple qui permet d'obtenir beaucoup de cellules sur un rein. Pas d'utilisation de digestion enzymatique.

Inconvénients: utilisable sur très peu d'espèces. Ne convient que pour les cellules proximales.

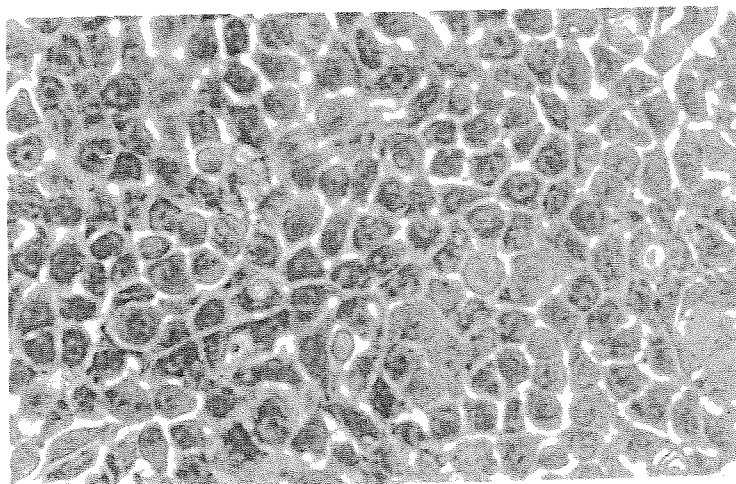
4 jours →

A



X 700

B

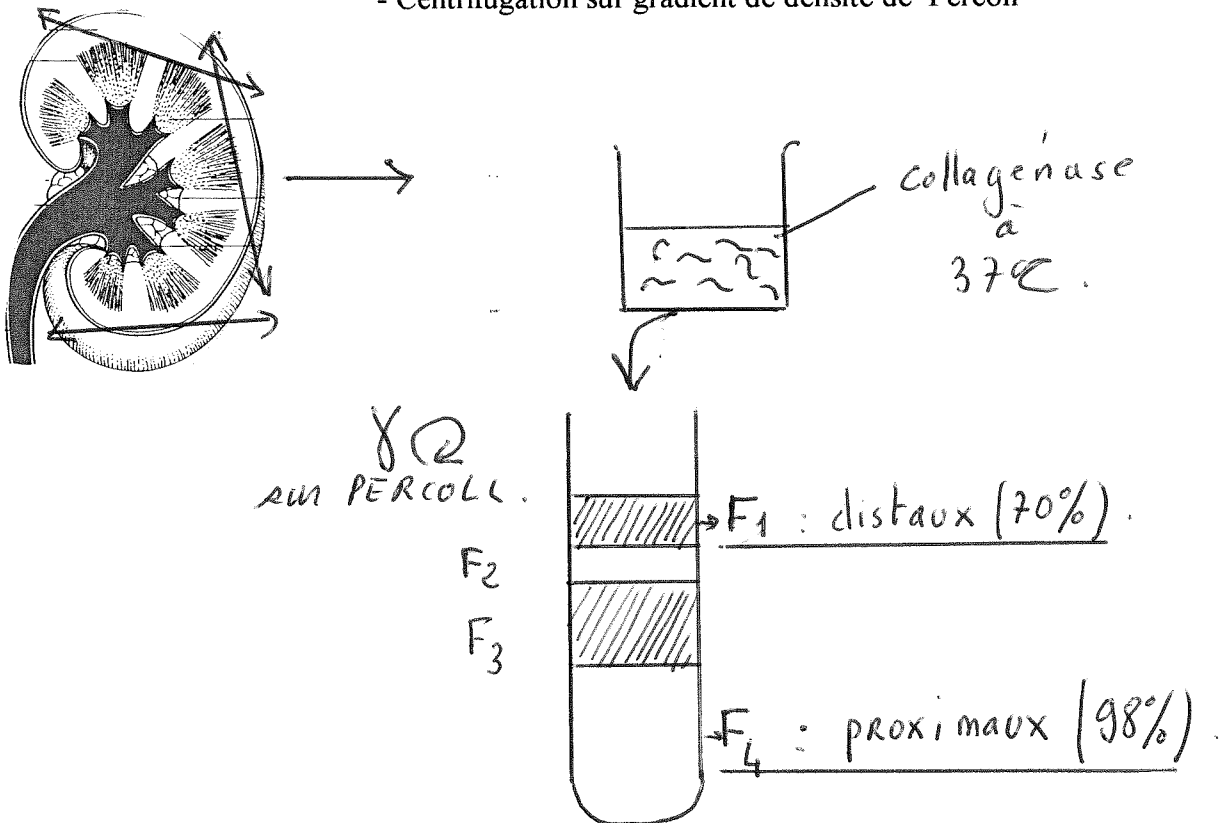


15 jours →

CULTURE PRIMAIRE DE CELLULES RÉNALES

II)- A PARTIR DE SUSPENSIONS DE TUBULES.

- Tranches de cortex
- Digestion protéolytique (élastase, collagénase etc.)
- Centrifugation sur gradient de densité de Percoll

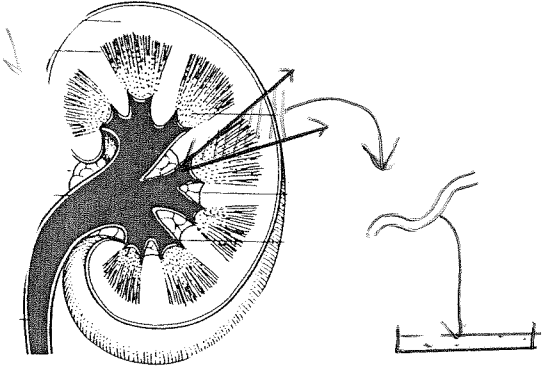


Avantages: Permet l'obtention de cultures originaires de différents segments du néphron: proximaux, distaux.

Inconvénients: Contamination car mélange possible de différents tubules à l'interface des bandes.

CULTURE PRIMAIRE DE CELLULES RÉNALES

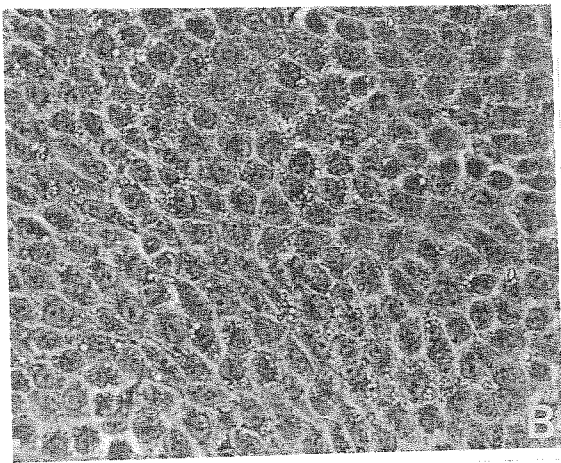
III)- A PARTIR DE SEGMENTS DE NÉPHRON ISOLÉS INDIVIDUELLEMENT PAR MICRODISSECTION



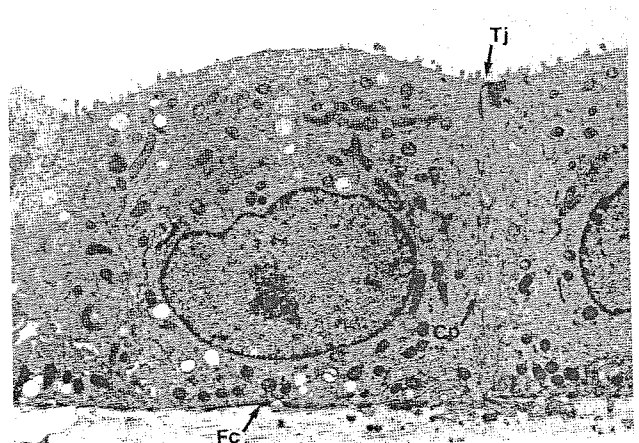
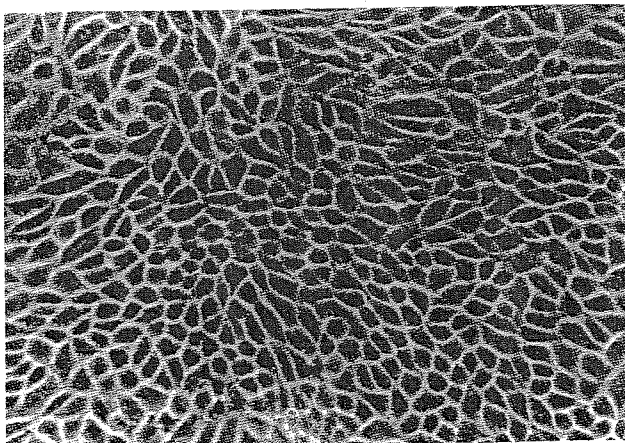
- Perfusion du rein en présence de collagénase pour éliminer le sang et permettre une bonne dissection.
- Découpage de petites pyramides et incubation à la collagénase
- Rinçage et microdissection de segments de néphron sous la loupe binoculaire.
- Ensemencement d'un segment de néphron par boîte de culture.

Avantages: Permet l'obtention de cultures originaires de chaque segments de néphron. différents. Pas de contamination par des cellules intersticielles ou d'autre partie du néphron. Très bonne différenciation des cultures.

Inconvénients: Peu de matériel. Technique lourde à mettre en place



PROXIMAL A 15 JOURS



DISTAL A 15 JOURS

TRANSFORMATION OF A RABBIT PROXIMAL CONVOLUTED TUBULE
IN A CELL MONOLAYER BEFORE CELL DIVISION OCCURRENCE.

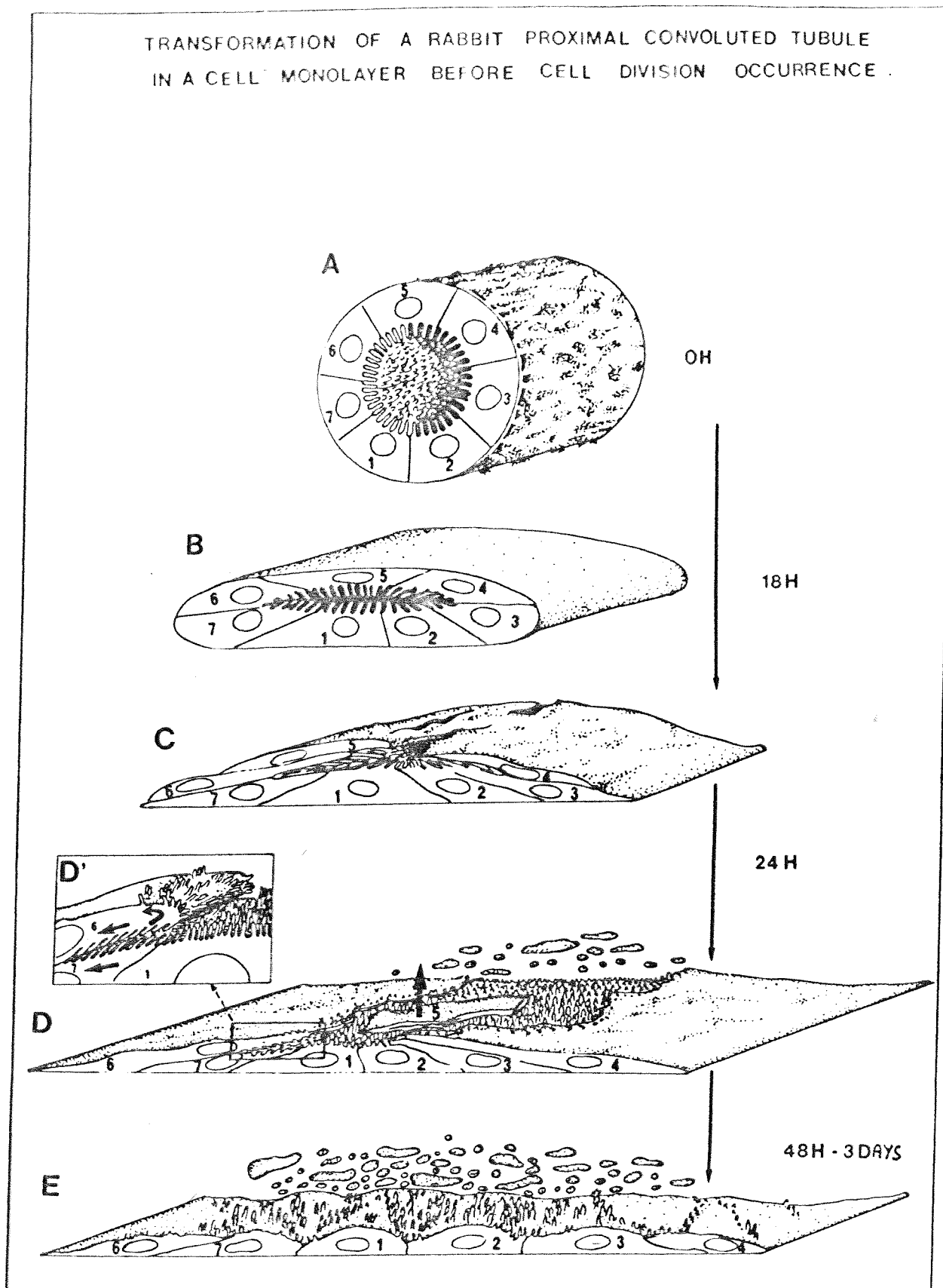


FIG 10

LIGNÉES DE CELLULES RÉNALES

I)- LIGNÉES CELLULAIRES PRE-ETABLIES

Il existe des lignées de cellules immortalisées disponibles dans le commerce et originaires de différentes parties du néphron.

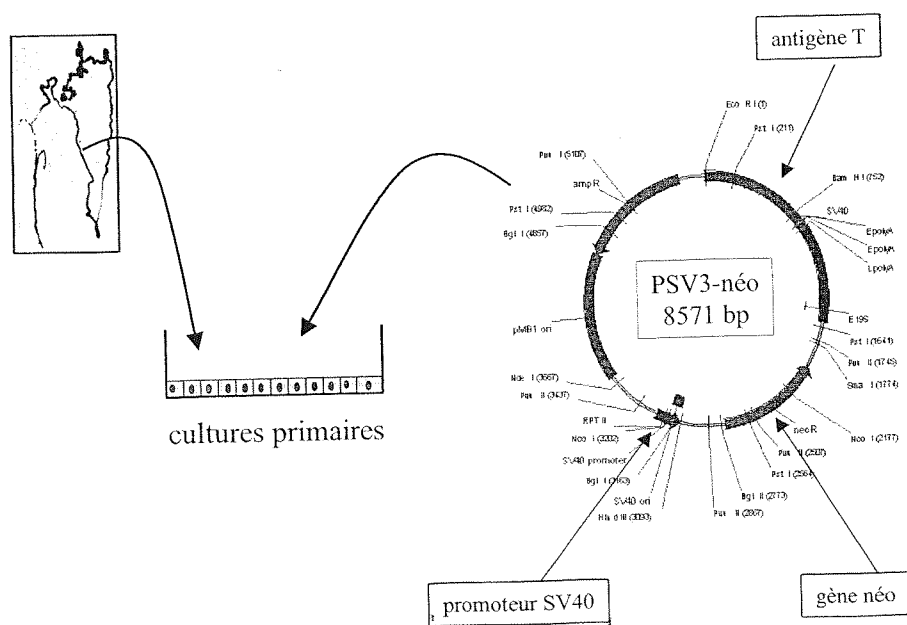
Les plus courantes: MDCK (Madin Darbin Canine Kidney cells). Issues de morceau de cortex rénal de rein de chien et immortalisées par repiquages successifs. Origine distale.
 LLC-PK1(Lilly Pig Kidney) Issues de morceau de rein de porc et immortalisées par repiquages successifs. Origine proximale.
 OK cells (Opossum Kidney cells). Issues de morceau de cortex rénal de rein Origine proximale

Avantages: Se gardent congelées dans l'azote en présence d'un cryo-protecteur. Très facile à remettre en culture Permet l'obtention de grandes quantités de matériel.

Inconvénients: Origine mal contrôlée. Important problèmes de dédifférenciation induisant des pertes de fonctions par rapport à l'épithélium original.

II)- LIGNÉES CELLULAIRES IMMORTALISÉES PAR TRANSFECTION

Elles sont généralement fabriquées au laboratoire. En ce qui concerne le rein, on part d'une culture primaire, d'un segment donné de néphron, âgée de 15 jours. Ces cultures sont transfectées avec un plasmide pSV3 néo en utilisant une technique au phosphate de calcium ou à la lipofectine pour introduire le plasmide dans la cellule. Sous le contrôle d'un promoteur fort (SV40) l'antigène T est traduit et va interagir avec les replicases de l'ADN. Les lignées stables sont établies en sélectionnant les cellules sur leur résistance à la néomycine qui leur sera conférée par l'expression du gène *neo*.



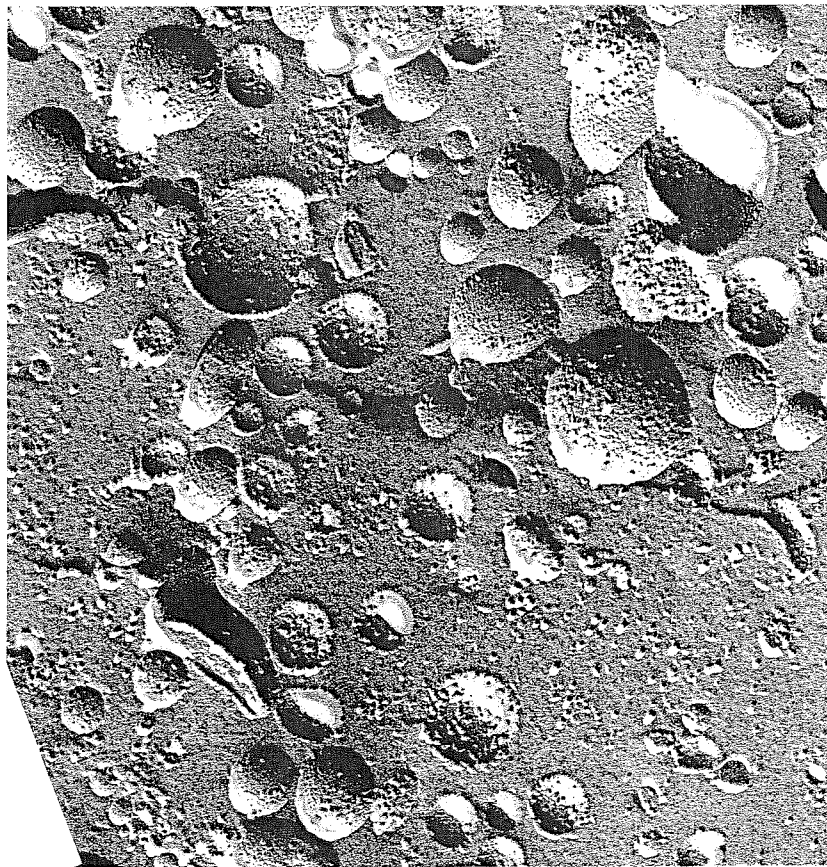
Avantages: Se gardent congelées dans l'azote en présence d'un cryo-protecteur. Très facile à remettre en culture Permet l'obtention de grandes quantités de matériel d'origine très bien définie.
Inconvénients: Problèmes de dédifférenciation induisant des pertes de fonctions par rapport à l'épithélium original.

VÉSICULES DE BORDURE EN BROSSE (BBMV)

PRÉPARATION AVEC LA TECHNIQUE DE PRÉCIPITATION AU CaCl_2

- Prélèvement du cortex et homogénéisation dans un tampon CaCl_2
- **Le CaCl_2 permet l'agrégation des membranes.**
- Par centrifugations et incubations au CaCl_2 successives, on obtient une préparation très enrichie en bordures en brosse.
 - la pureté de ces bordures en brosse est testée par dosage d'enzymes spécifiques uniquement présentes dans les membranes apicales du tubule proximal (phosphatase alcaline, gamma glutamyl transférase, aminopeptidase etc.)
 - Les contaminations possibles par des membranes provenant d'autres compartiments cellulaires est testée par dosages d'enzymes spécifiques de ces compartiments.
 - **Une bonne préparation doit présenter un enrichissement d'au moins 12 fois en enzymes spécifiques de la bordure en brosse et pas d'enrichissement en autres enzymes (par rapport à l'homogénat initial).** Taille des vésicules : entre 0.5 et 2 μ de diamètre.

Inconvénients: on ne peut obtenir des vésicules de membrane apicale que du tubule proximal. Il existe d'autre techniques qui permettent d'enrichir en membranes basolatérales mais elles sont moins fiables.



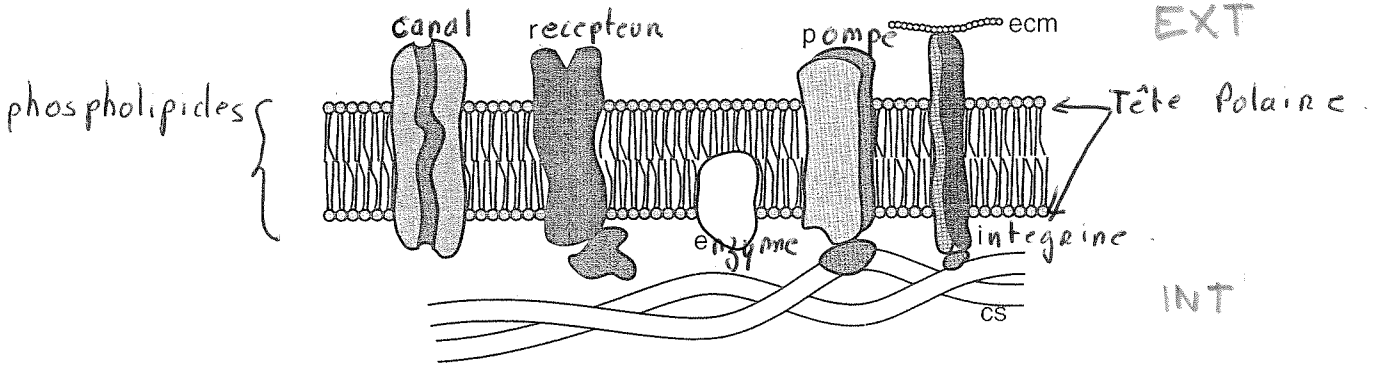
PRÉPARATION DE BBMV OBSERVÉE, APRES
CRYOFRACTURE, AU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE

**GENERALITES SUR LES DIFFERENTS
MECANISMES DE TRANSPORT**

COMPARTIMENTS LIQUIDIENS DE L'ORGANISME

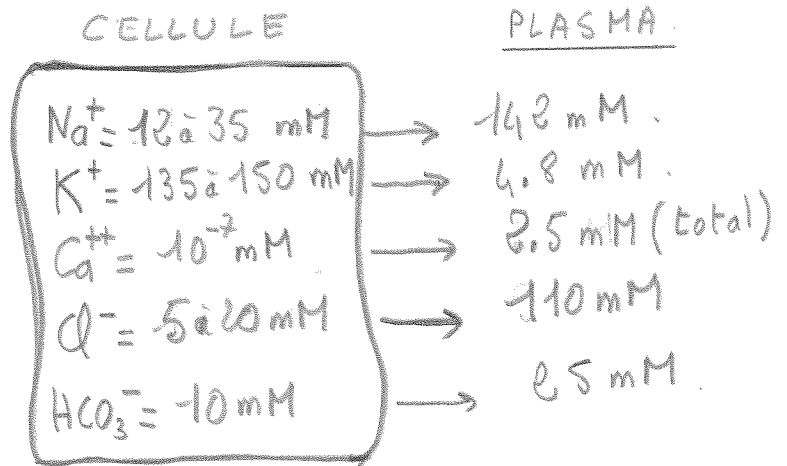
LA MEMBRANE PLASMIQUE

- Les organismes vivants sont composés de milieux liquides séparés par des membranes plus ou moins perméables. Les membranes plasmiques sont organisées selon le modèle de la mosaïque fluide (Singer et Nicholson, 1972).

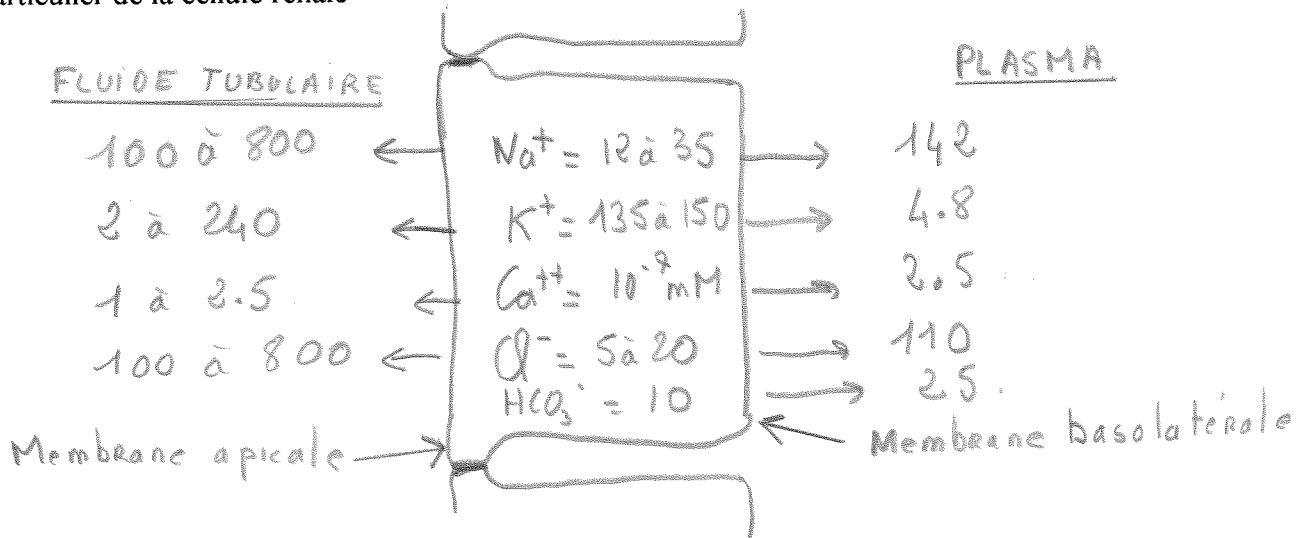


CONCENTRATIONS IONIQUES

Modèle général



Cas particulier de la cellule rénale



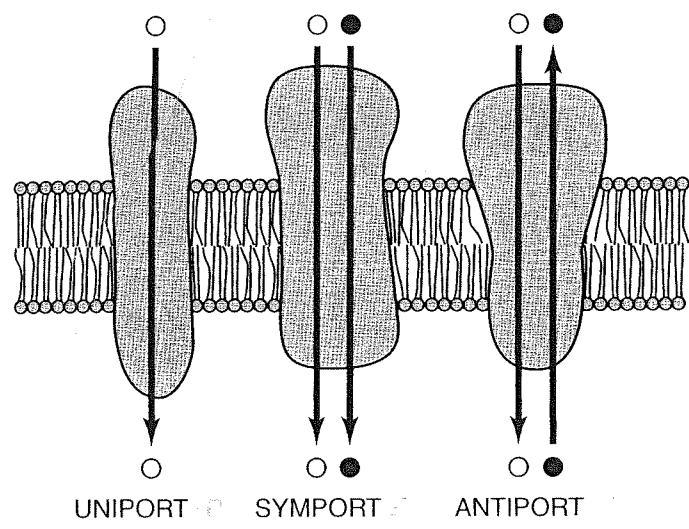
PERMEABILITE MEMBRANAIRE

- Les petites molécules apolaires diffusent librement et rapidement (O_2 , N_2)
- Les petites molécules polaires non chargées diffusent plus lentement (CO_2 , H_2O , urée)
- Les grosses molécules polaires et chargées ne diffusent pratiquement pas (glucides, acides aminés)
- Les grosses molécules et les ions ne diffusent pas.

La présence de transporteurs est donc nécessaire pour permettre aux petites molécules et aux ions de traverser la membrane.

LES PROTEINES DE TRANSPORTS

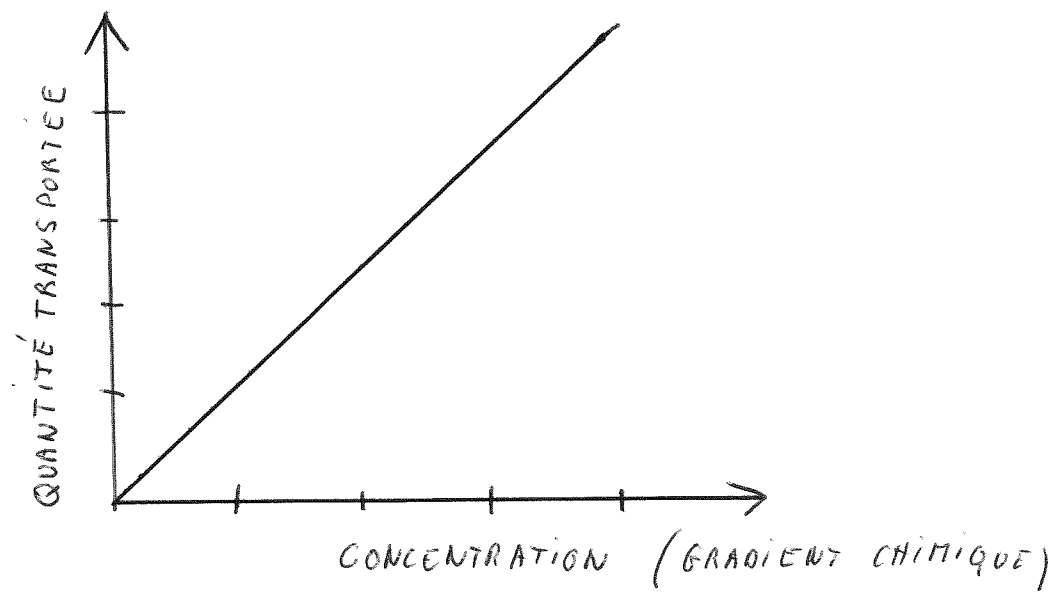
DIFFERENTS TRANSPORTEURS



Ces transporteurs sont classés en trois groupes:

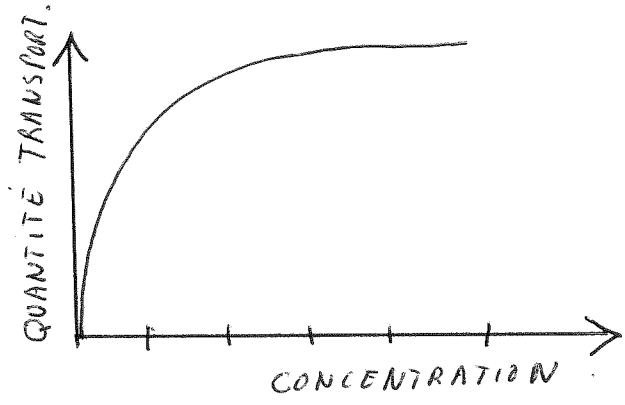
1) Transport passif:

Les composés traversent la membranes selon leur gradient de concentration ou leur gradient électrochimique. C'est une simple diffusion. Il n'y a aucune interaction avec la protéine de transport. Il n'y a pas de saturation. Seule la taille du composé est limitante. Exemples: passages à travers certaines jonctions de type gap.

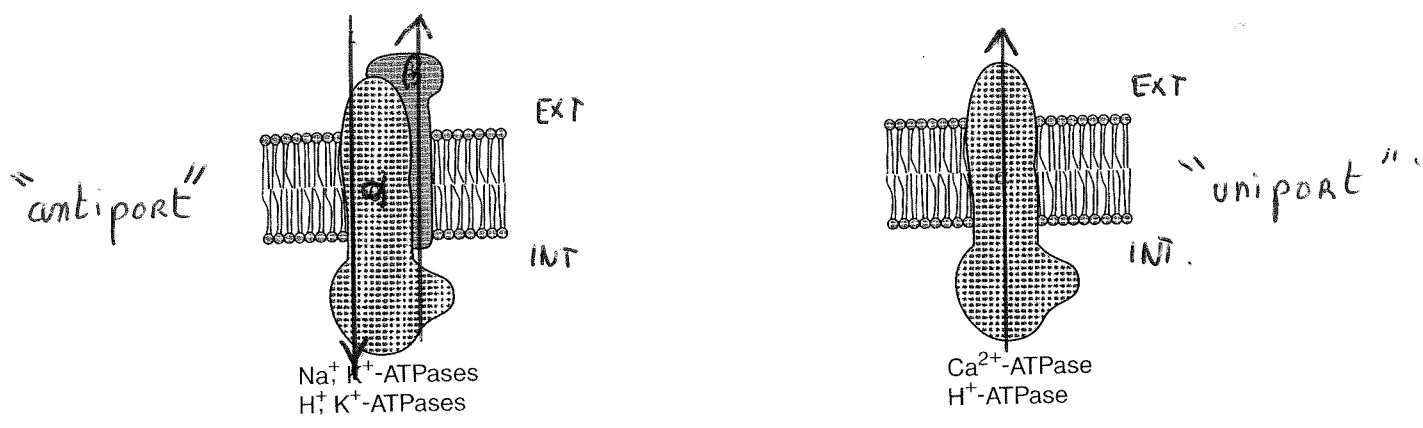


LES PROTEINES DE TRANSPORTS (suite)

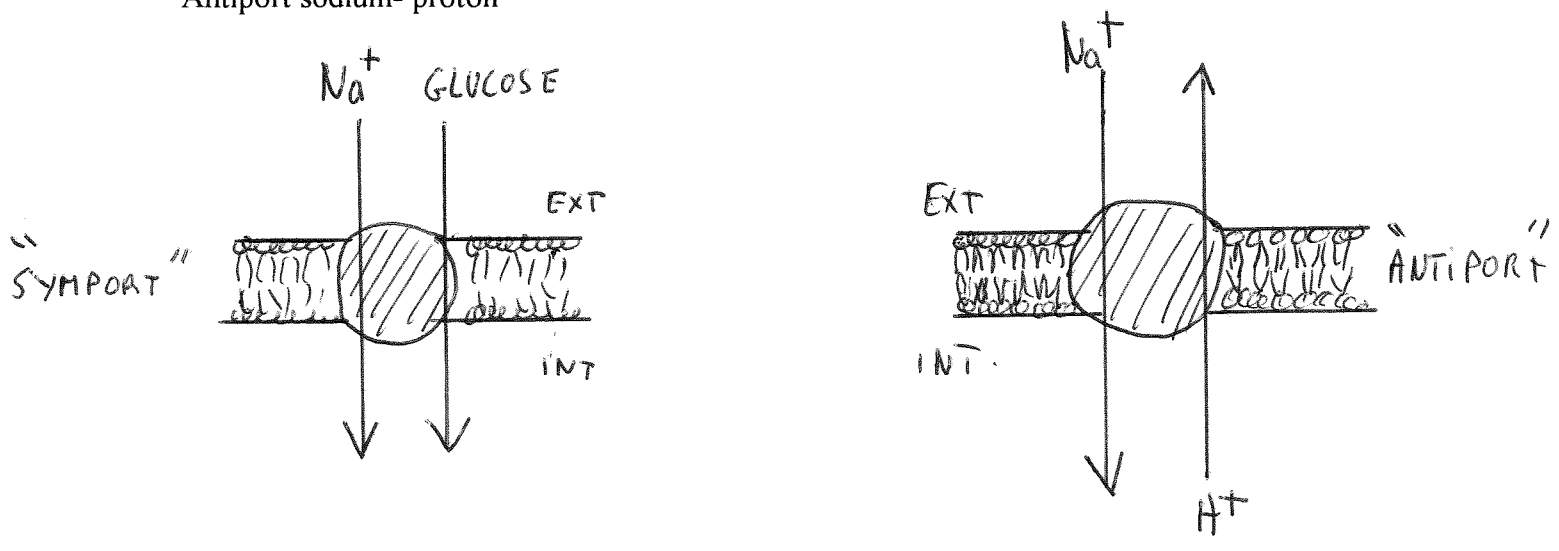
2) **Transport actif** : Le transporteur va faire passer le composé contre son gradient de concentration ce qui nécessite un apport d'énergie. Il y a une interaction avec la protéine de transport. Il y a saturation.



Transport actif primaire: l'énergie est fournie par l'hydrolyse de l'ATP. C'est le cas des ATP ases



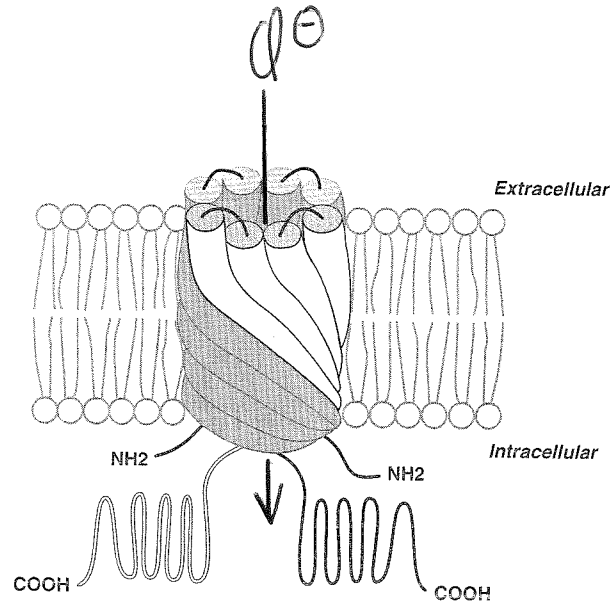
Transport actif secondaire : L'énergie est fournie par le gradient chimique d'un autre composé. Exemples: cotransports sodium-glucose, sodium acides aminés, sodium phosphate. Antiport sodium- proton



LES PROTEINES DE TRANSPORTS (suite)

3) **Diffusion facilitée:** Le transport est passif mais le transporteur améliore le passage en interagissant avec le composé. Le système est saturable.

Exemples: transporteurs de glucose sur la membrane basolatérale
Canaux ioniques.



TOPOLOGIE SUPPOSÉE D'UN CANAL
PERMEABLE AUX IONS Cl^- .

NOTION DE FORCE MOTRICE ("DRIVING FORCE")

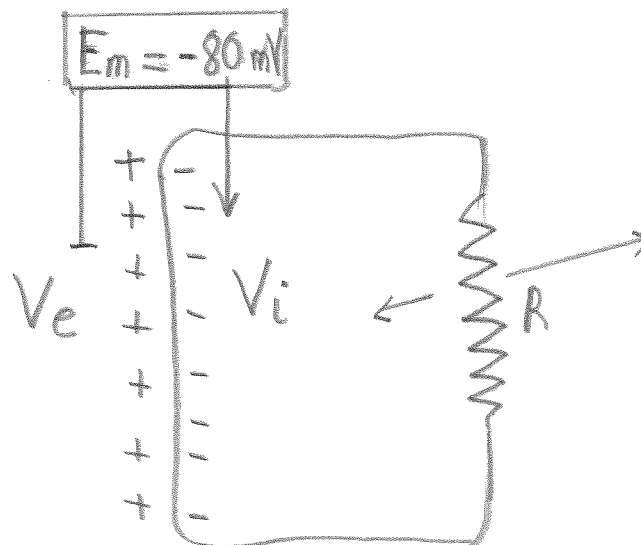
I)- RAPPEL

Le passage des ions à travers les membranes biologiques entraîne des courants ioniques (électriques). Ce courant I est faible. Il s'exprime en micro Ampères (ou nanoA, ou picoA) et représente le débit des ions s'écoulant de part et d'autre de la membrane.

Le potentiel électrique V représente la quantité de charges en un point, c'est à dire le bilan en quantité des charges portées par les ions négatifs et les ions positifs. Pour une cellule, par convention, le potentiel du milieu externe est pris comme référence. La différence de potentiel membranaire E_m (en mV) est donnée par la relation

$$E_m = V_{interne} - V_{externe}$$

$V_{interne}$ est le potentiel électrique à l'intérieur de la cellule. Une cellule au repos possède un excès de charges négatives à l'intérieur par rapport à l'extérieur. E_m est donc négatif et la cellule est polarisée. Si le potentiel devient plus négatif, la cellule s'hyperpolarise. Si le potentiel devient plus positif, la cellule se dépolarise. Le potentiel membranaire varie d'un type cellulaire à l'autre mais en général on peut considérer qu'il est aux alentours de - 80 mV.



La membrane cellulaire n'est pas librement perméable aux ions, elle offre donc une certaine résistance au passage des ions. C'est la résistance membranaire R qui s'exprime en mega Ω ou giga Ω

L'inverse de la résistance représente la conductance g et elle s'exprime en μ Siemens (ou nanoS, ou picoS). On aura donc la relation $R = 1/g$

La loi d'Ohm relie le potentiel, le courant et la résistance : $E_m = R \times I$

NOTION DE FORCE MOTRICE ("DRIVING FORCE")

II) LES TRANSPORTS ACTIFS ET PASSIFS PEUVENT ÊTRE ÉVALUÉS EN CONSIDÉRANT LA FORCE MOTRICE.

La force motrice qui va permettre de faire passer un composé à travers la membrane va dépendre de la nature de ce composé.

Pour une molécule neutre cette force dépendra uniquement de la différence de concentration entre le milieu extracellulaire et le milieu intracellulaire. La molécule ira toujours du milieu le plus concentré au milieu le moins concentré. On parle de gradient chimique

Pour une molécule chargée (ion par exemple) la force dépendra de la différence de concentration mais également du potentiel électrique à travers la membrane. On parle de gradient électrochimique. Dans ce cas la force motrice correspond à la différence de potentiel électrochimique ($\Delta\mu_j$) pour l'ion j selon l'équation :

$$\Delta\mu_{j \text{ (int } \rightarrow \text{ ext)}} = z.E_m F + RT \text{ Log } (C_j \text{ int} / C_j \text{ ext})$$

Log = logarithme népérien (Log = 2.3 log)

z = valence de l'ion

Em = différence de potentiel membranaire

R = constante des gaz parfaits. T= température absolue

C_j concentration de l'ion à l'intérieur et l'extérieur de la cellule

Pour une molécule non chargée, z = 0 et on a alors

$$\Delta\mu_{j \text{ (int } \rightarrow \text{ ext)}} = RT \text{ Log } (C_j \text{ int} / C_j \text{ ext}).$$

Finalemnt:

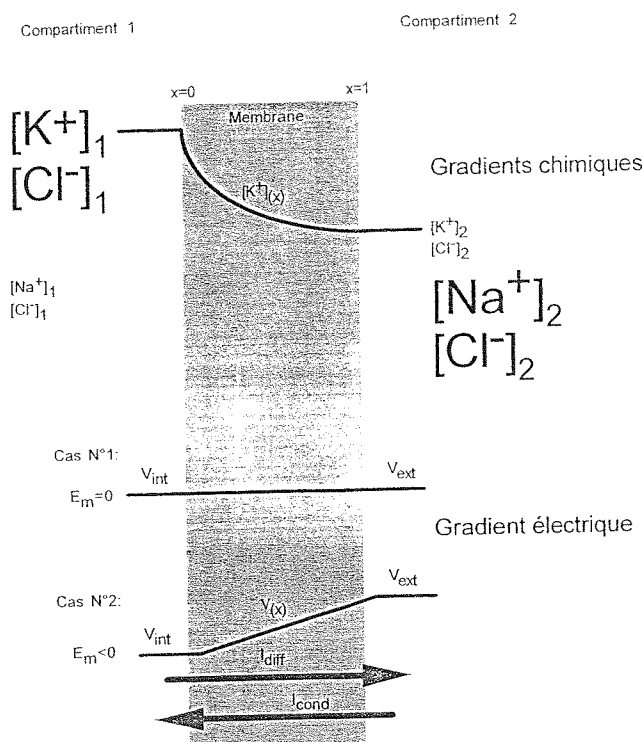
- si $\Delta\mu$, est >0 , cela signifie que le passage de l'ion fournit un travail (la force motrice est favorable au passage de l'intérieur vers l'extérieur) et le **transport sera passif** dans le sens intérieur vers extérieur.

- si $\Delta\mu$, est <0 , cela signifie que le passage de l'ion nécessite un travail (la force motrice est défavorable au passage de l'intérieur vers l'extérieur) et de l'énergie devra être fournie au système pour avoir un passage dans le sens intérieur vers extérieur. **Le transport sera donc actif.**

I)- ÉLECTRODIFFUSION

Ce phénomène repose sur les hypothèses suivantes :

- La membrane est un milieu homogène.
- Les ions traversent de manière indépendante sans interactions entre eux
- Le champ électrique à travers la membrane est constant.



On considère deux compartiments liquidiens séparés par une membrane avec des milieux de compositions différentes proches du milieu interne (1) et externe (2) d'une cellule. Chaque compartiment est électroneutre : les charges positives (Na^+ , K^+) compensent les négatives (Cl^-)

On envisage deux cas :

-1) La membrane est imperméable aux ions: le potentiel transmembranaire est alors nul.

-2) La membrane est perméable au seul ion K^+ (canal potassium par exemple): Le K^+ va diffuser selon son gradient chimique. Ce flux d'ions crée un **courant de diffusion** I_{diff} . Si les autres ions ne diffusent pas à travers la membrane, le flux de K^+ va alors générer un excès de charges négatives sur la face 1 et un excès de charges positives sur la face 2. Ce gradient de charges va produire un mouvement de K^+ en sens inverse induisant ainsi un **courant de conduction** I_{cond} . Le courant total d'ion K^+ est la somme de ces deux courants

$$I_{\text{K}^+} = I_{\text{diff}} + I_{\text{cond}}$$

Ce courant est décrit par l'équation de l'électrodiffusion de NERNST-PLANCK

$$I_{\text{ion}} = -z.F.D \left(\frac{d[\text{ion}]}{dx} + \frac{F.z}{RT} \cdot \frac{dV}{dx} \right)$$

avec:

I_{ion} = densité de courant de l'ion (A/cm^2)

z = valence de l'ion. F = constante de Faraday (96500 C).

D = coefficient de diffusion de l'ion (cm^2/s). $[\text{ion}]$ = concentration de l'ion à la distance x (M)

x : distance dans le pore ionique (cm). E_m = différence de potentiel membranaire

R = constante des gaz parfaits $8.315 \text{ Joules} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mole}^{-1}$. T = température absolue ($^\circ\text{K} = ^\circ\text{C} + 273$)

$V(x)$ = potentiel à la distance x (V)

II)- LOI DE NERNST

Dans l'exemple précédent, tant que les deux gradients chimique et électrique sont différents, le **gradient électrochimique** n'est pas nul et il y aura passage de K^+ , c'est à dire un courant ionique potassique. Au bout d'un moment les gradients ioniques et électriques seront égaux et de sens opposés et le gradient électrochimique sera nul. A l'équilibre, la valeur du gradient électrique est appelée **potentiel d'équilibre de l'ion K^+ : E_{K^+}**

Ce potentiel d'équilibre ne dépend que de la nature de l'ion et des concentrations de part et d'autre de la membrane, il est défini par la loi de Nernst :

$$E_{ion} = -RT/zF \text{ Log } [ion]_{int} / [ion]_{ext}$$

On remarque que l'équation correspond à l'équation de Nernst-Planck avec $I_{ion} = 0$

Si $z = 1$ et à $20^\circ C$ on aura:

$$E_{ion} = -58 \log [ion]_{int} / [ion]_{ext}$$

Par exemple pour le potassium :

Pour le K^+ avec $K^+_{int} = 140 \text{ mM}$ et $K^+_{ext} = 5 \text{ mM}$

$$E_{K^+} = -58 \log 140 / 5 = 84 \text{ mV}$$

	Interne	Externe	$E_{ion} = -58 \log [Ion]_{int} / [Ion]_{ext}$
Na^+	14	140	+ 58 mV
K^+	160	3	- 100 mV
Ca^{++}	10^{-4}	1	+ 232 mV
Cl^-	14	150	- 60 mV

Nota: pour les ions Cl^- , le rapport des concentrations est inversé.

PHYSIOLOGIE DE LA CELLULE PROXIMALE

**ROLE DES MACRO ET MICRODOMAINES MEMBRANAIRES DANS
LES TRANSPORTS DE SOLUTES ET D'ELECTROLYTES**

POLARITE CELLULAIRE

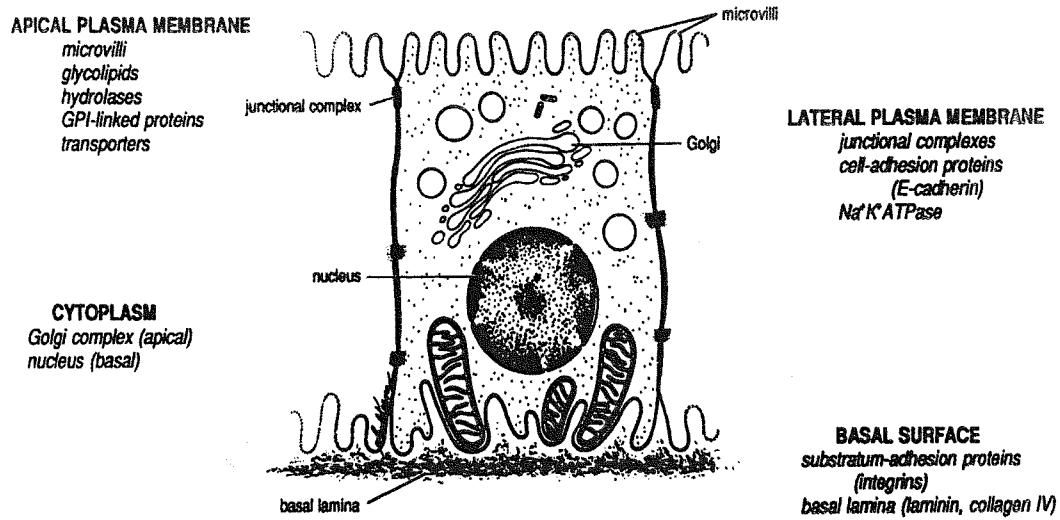
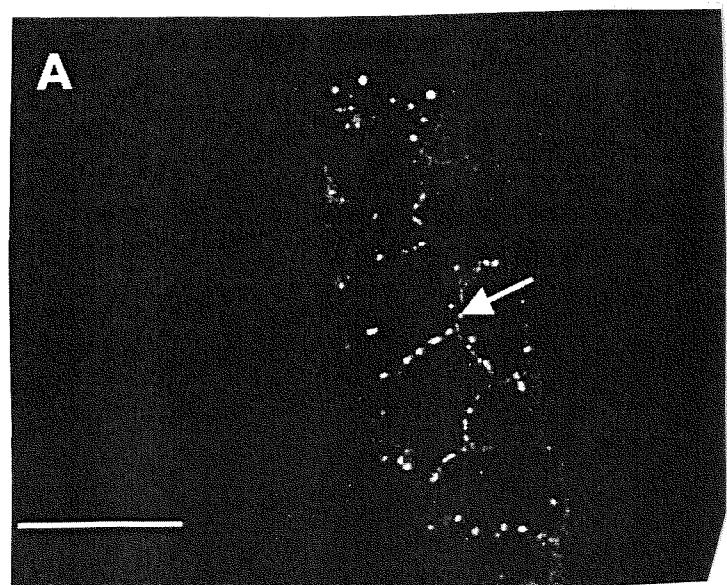


FIGURE 24-1. Diagram of a "typical" epithelial cell, illustrating some features that are characteristic of the polarized cell phenotype (from ref. 56).

La "TIGHT" JUNCTION

Protéines formant la jonction:

- Intégrées à la membrane : occludines et claudines 5. la Claudine 2 est spécifique du TP
- Cytoplasmiques mais localisées à la périphérie de la jonction: ZO1 et ZO2 , cinguline. Pas vraiment spécifique du TP



CLAUDINE 2.
(Leaky" epithelions)

OCCUDINE

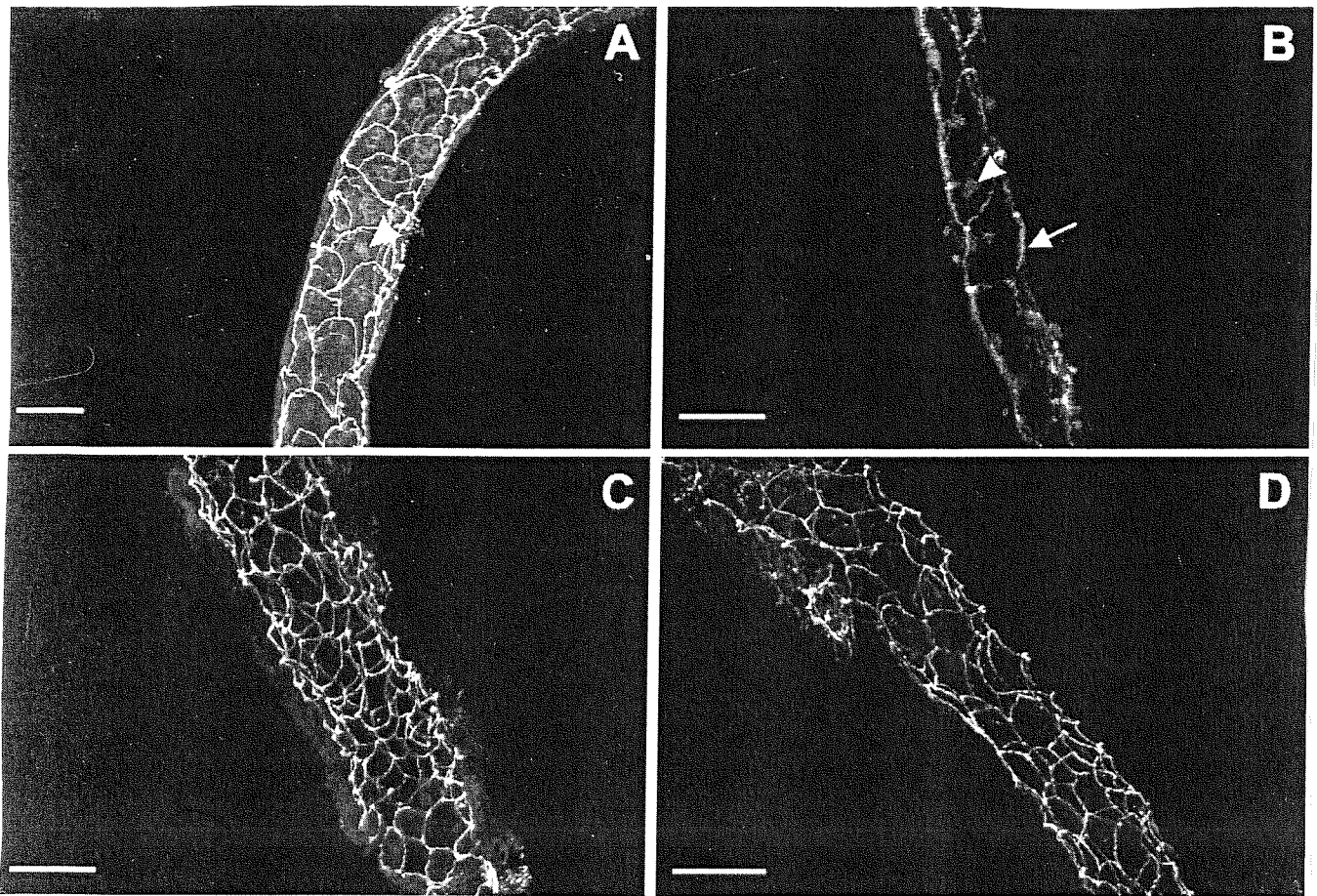
La "TIGHT" JUNCTION(suite...) *PROTEINES ZONULA OCCLUDENS*

Fig. 4. Localization of ZO-1 in renal tubules. Tubules were stained with rabbit anti-ZO-1 polyclonal antibodies. In proximal (A), Henle's (B), distal (C), and collecting (D) tubules, ZO-1 staining is clearly arranged as a chicken fence, surrounding the tubular lumen. In proximal tubules,

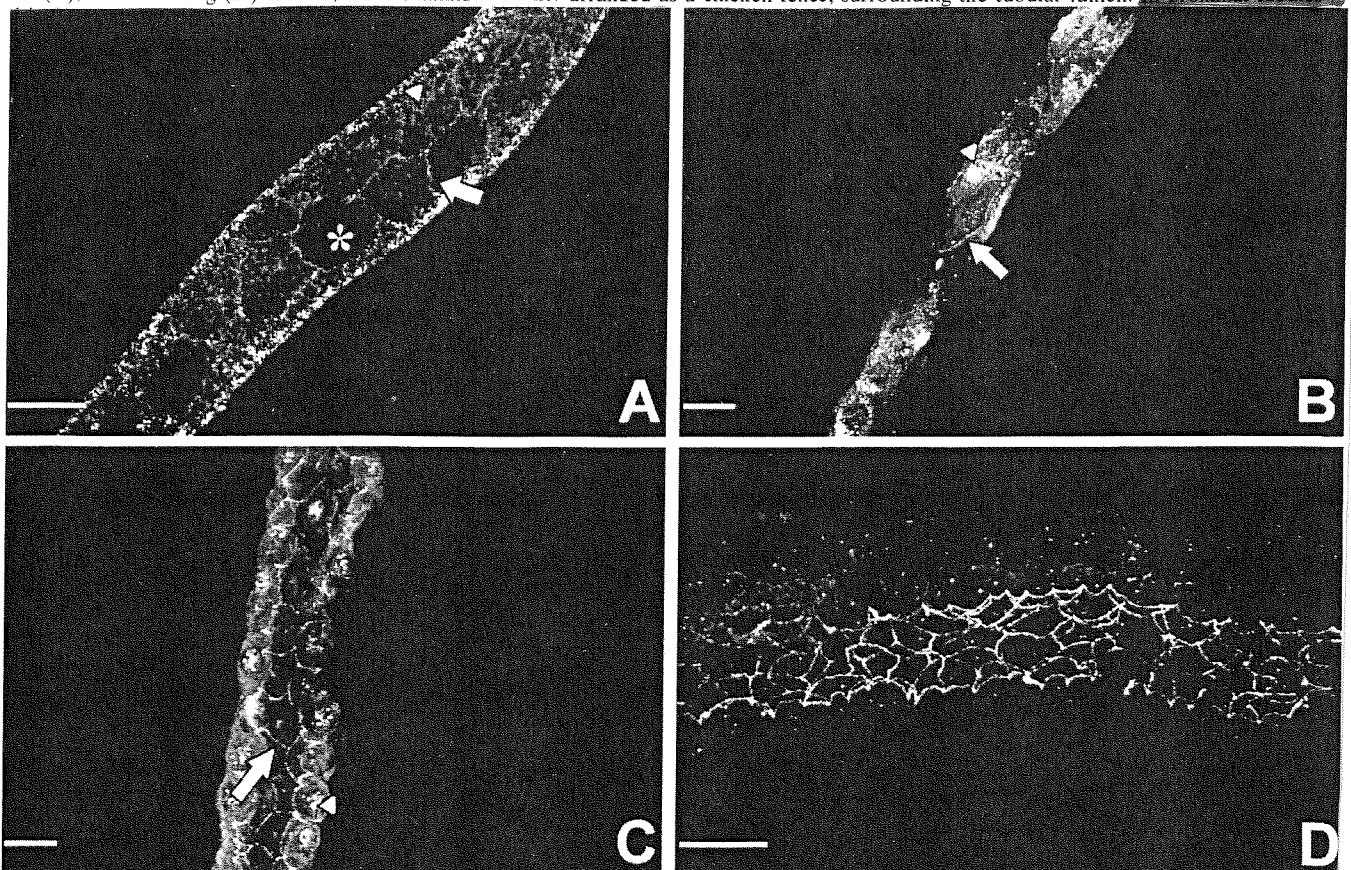


Fig. 6. Localization of ZO-2 in renal tubules. Tubules were stained with rabbit anti-ZO-2 polyclonal antibodies. ZO-2 staining along the cell borders is very faint in proximal tubules (A, arrow), while several cells display a punctuated cytoplasmic staining (arrowhead), others are free of it (asterisks). In Henle's loop (B), ZO-2 clearly stains cell borders (arrow) as well as nuclei (arrowhead). In distal tubules (C), ZO-2 is concentrated at cell borders (arrow) and depicts a dense stain at cell nuclei (arrowhead). In collecting tubules (D), ZO-2 forms a network sharply defined. In contrast to distal and Henle's loop, fluorescence is less intense in the nuclei of the collecting tubules.

-LES DOMAINES DE LA MEMBRANE PLASMIQUE:

Macrodomaines:

* **La bordure en brosse** : augmentation de la surface d'échange. Elle contient une énorme quantité de protéines de transport et d'enzymes.

La microvillosité est constituée d'un coeur central de filaments d'actine ainsi que de la villine et de la fimbrine.

La base de la microvillosité est spécialisée dans l'endocytose. Elle est couverte de clathrine.

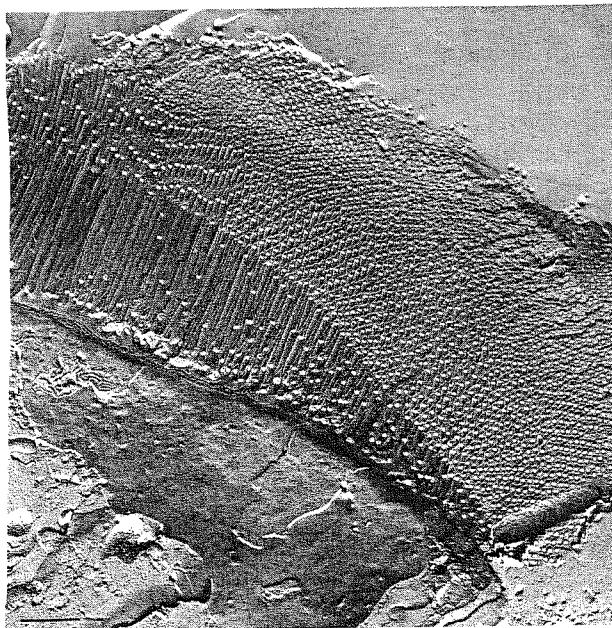


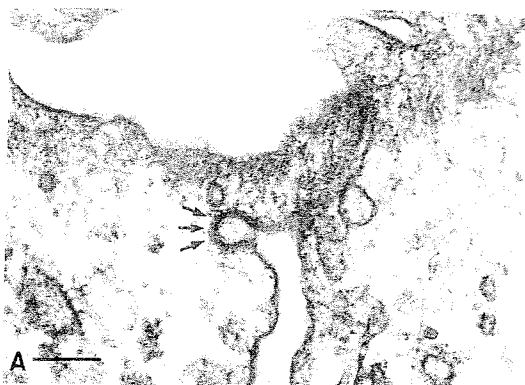
FIGURE 24-3. Freeze-fracture electron micrograph showing the extensive microvillar brush-border amplification of the proximal tubule apical membrane. Bar = 1 μ m.

* **La membrane basolatérale**: Des replis de la membrane plasmique augmente la surface. Ils enserrant de larges mitochondries.

Microdomaines:

Puits de clathrine de la bordure en brosse: ils jouent un rôle essentiel dans le recyclage des protéines membranaires(voir le rôle de la mégaline page 64(2))

Caveolae de la membrane basolatérale: vésicules de pinocytose qui auraient un rôle voisin des puits de clathrine.



COATED PITS



CAVEOLAE

PHYSIOLOGIE DE LA CELLULE PROXIMALE

Transport de glucose.

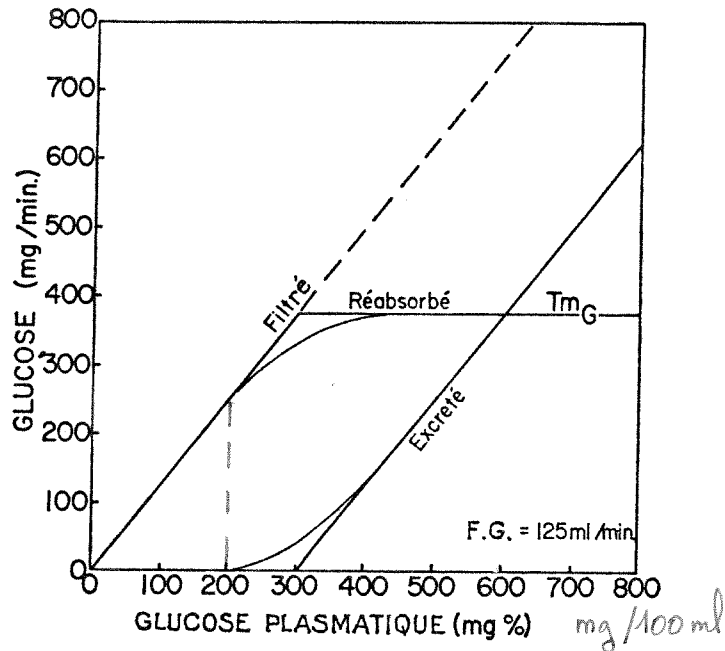


FIG. 30. — Titration d'un tubule rénal humain en ce qui concerne le glucose.

$$\underline{Q_F = F.G \times [GLU]_p.}$$

$$\underline{Q_E = \dot{V} \times [GLU]_u.}$$

$$\underline{Q_R = Q_F - Q_E.}$$

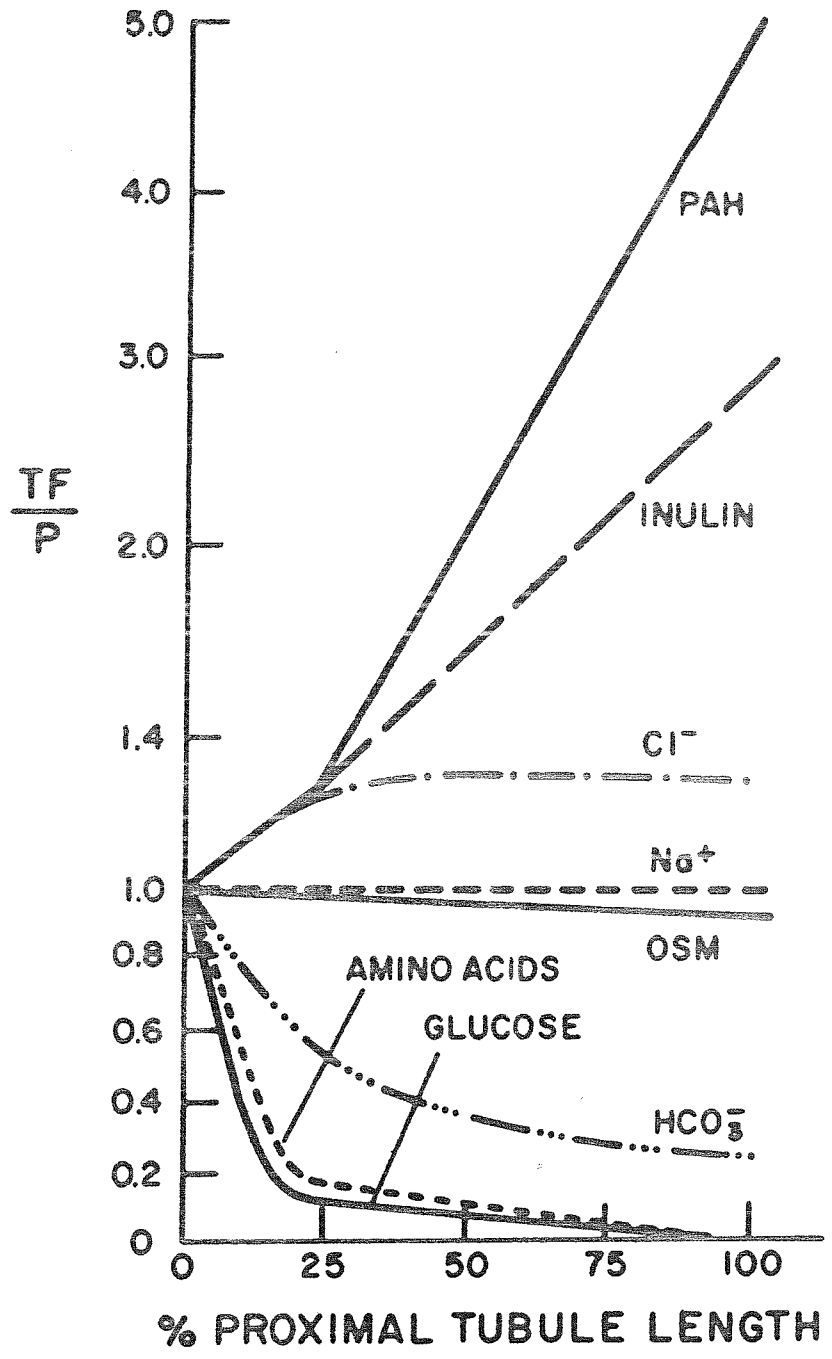


Figure 7-6. Reabsorption of various solutes along the entire proximal tubule in relation to the potential difference (PD). TF/P represents ratio of tubule fluid to plasma concentration. The area above the line for inulin represents solutes that are secreted; the area below the line for inulin represents solutes that are reabsorbed. PAH, para-aminohippurate; OSM, osmolality. (Modified from Rector, F. C., Jr.: Sodium, bicarbonate, and chloride absorption by proximal tubule. *Am. J. Physiol.* 244:F461, 1983.)

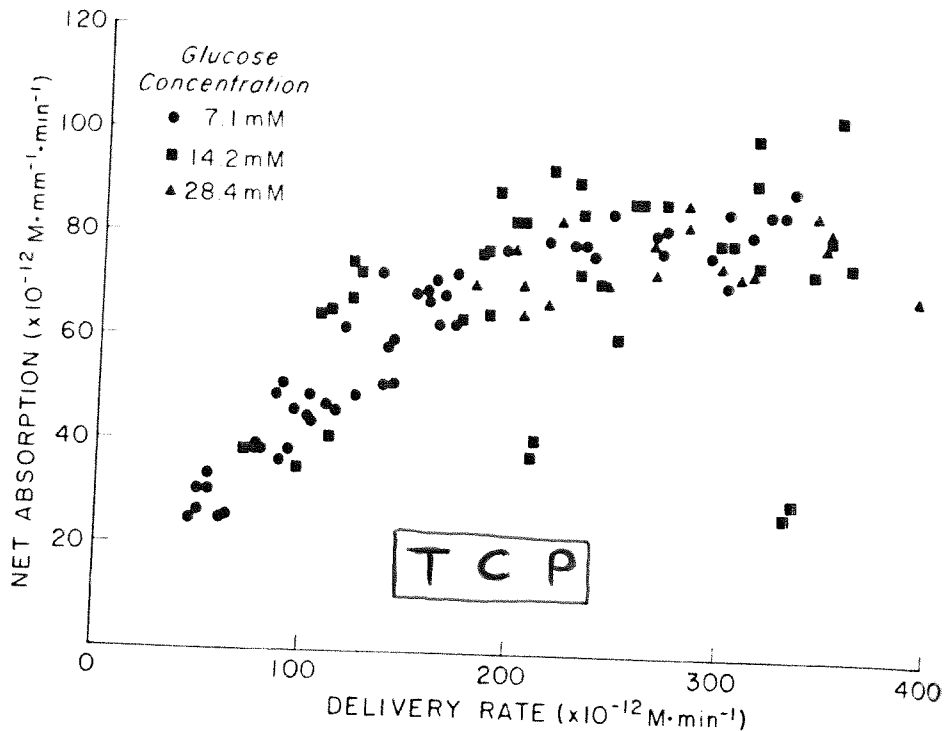


FIG. 1. Relationship between delivery rate and net absorption of glucose in proximal convoluted tubules. Tubules were perfused at 7.1, 14.2, and 28.4 mM glucose concentrations.

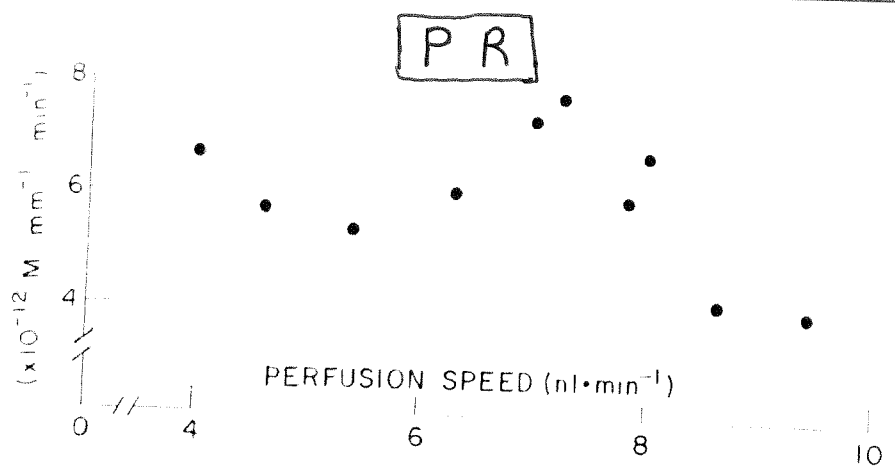
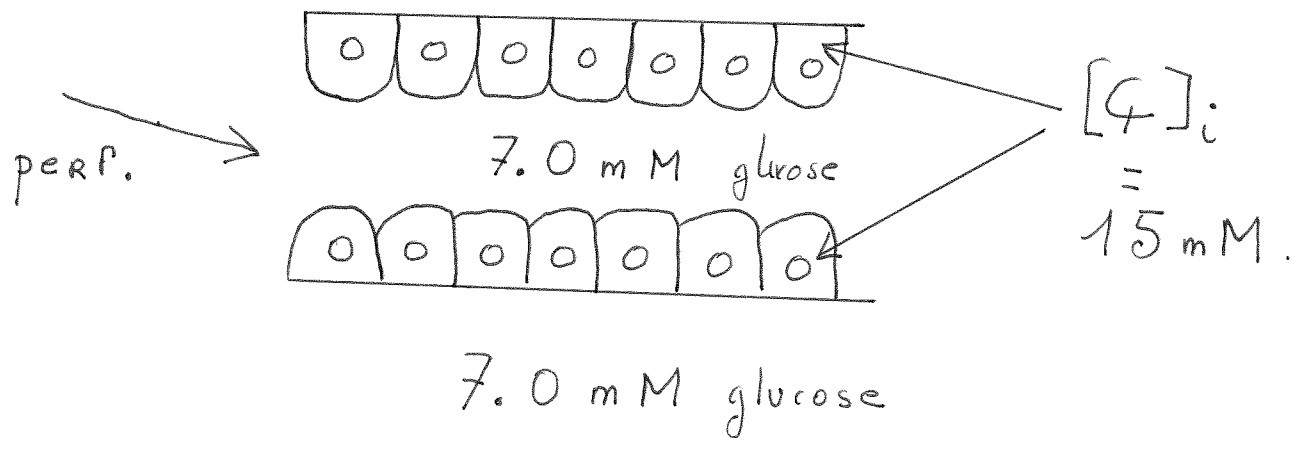
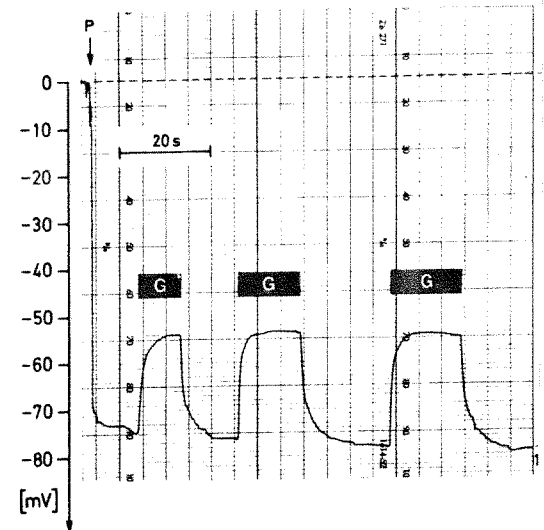
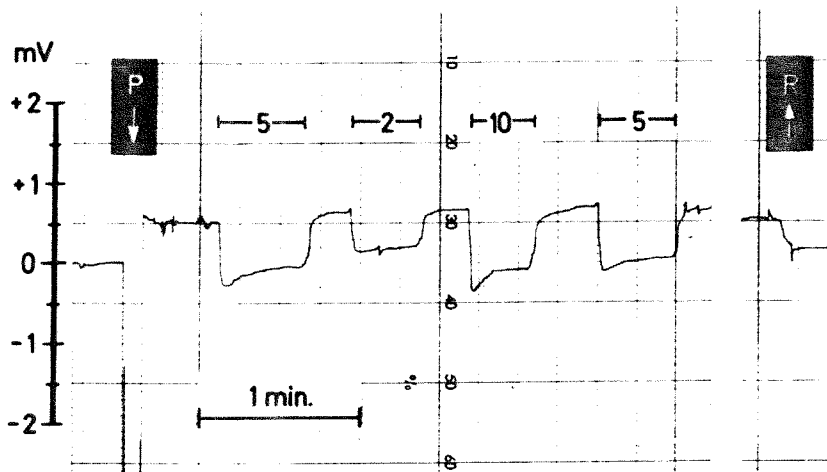
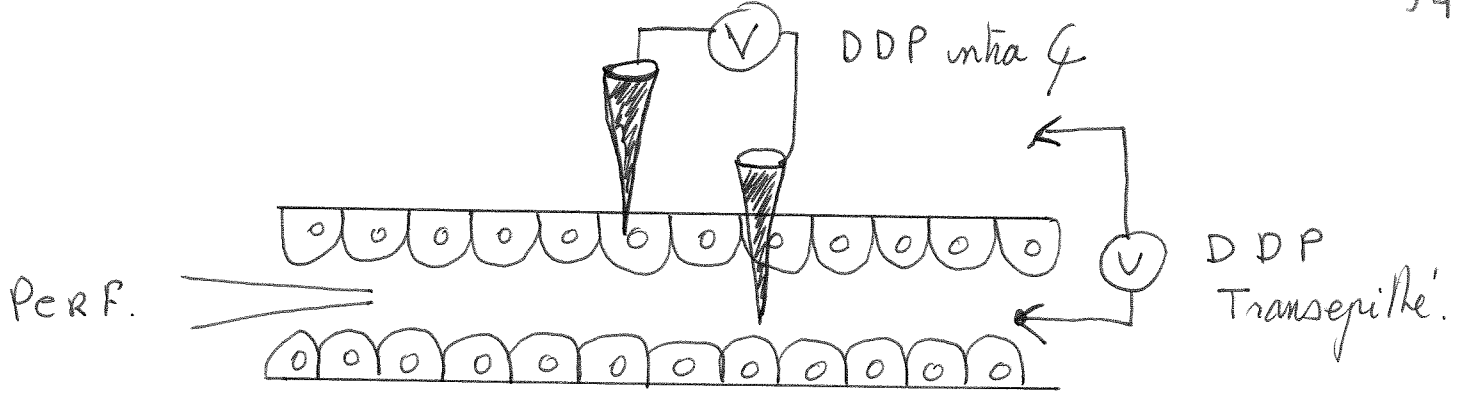


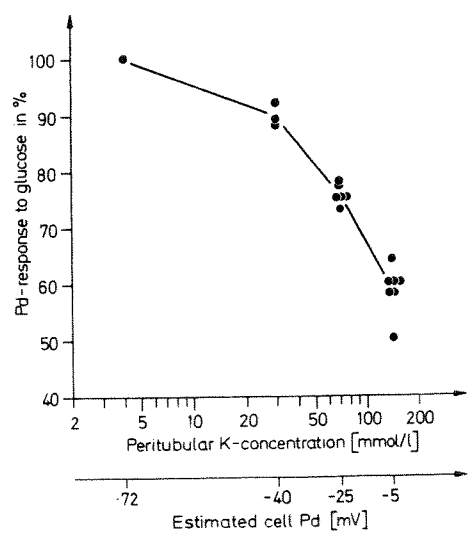
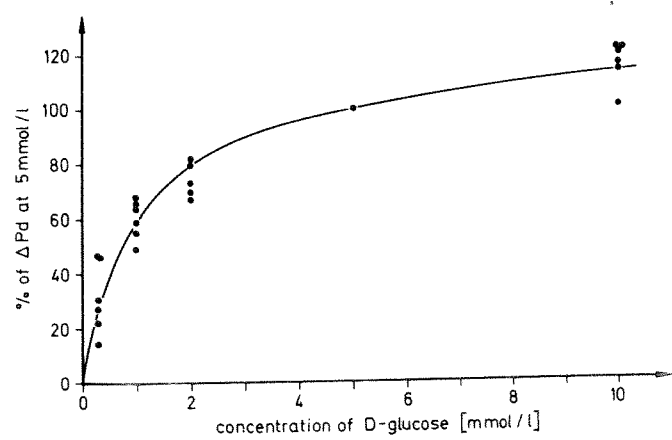
FIG. 2. Relationship between perfusion speed and net glucose absorption in proximal straight tubules. Tubules were perfused at 7.1 mM glucose concentration.





① DDP TRANSEPIITHELIALE

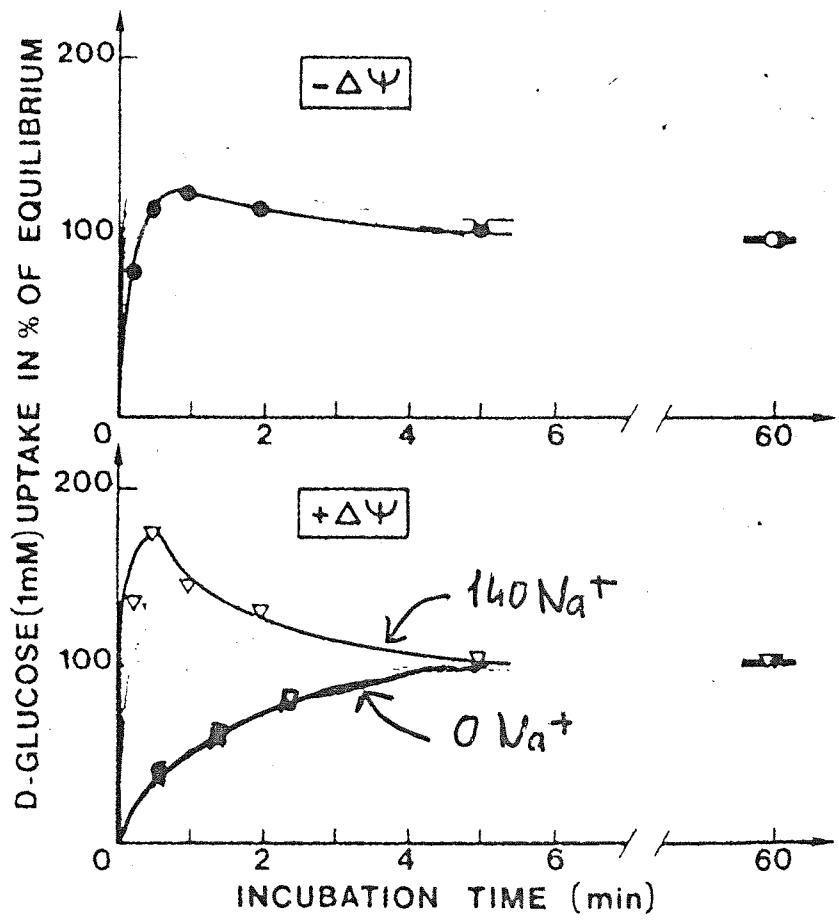
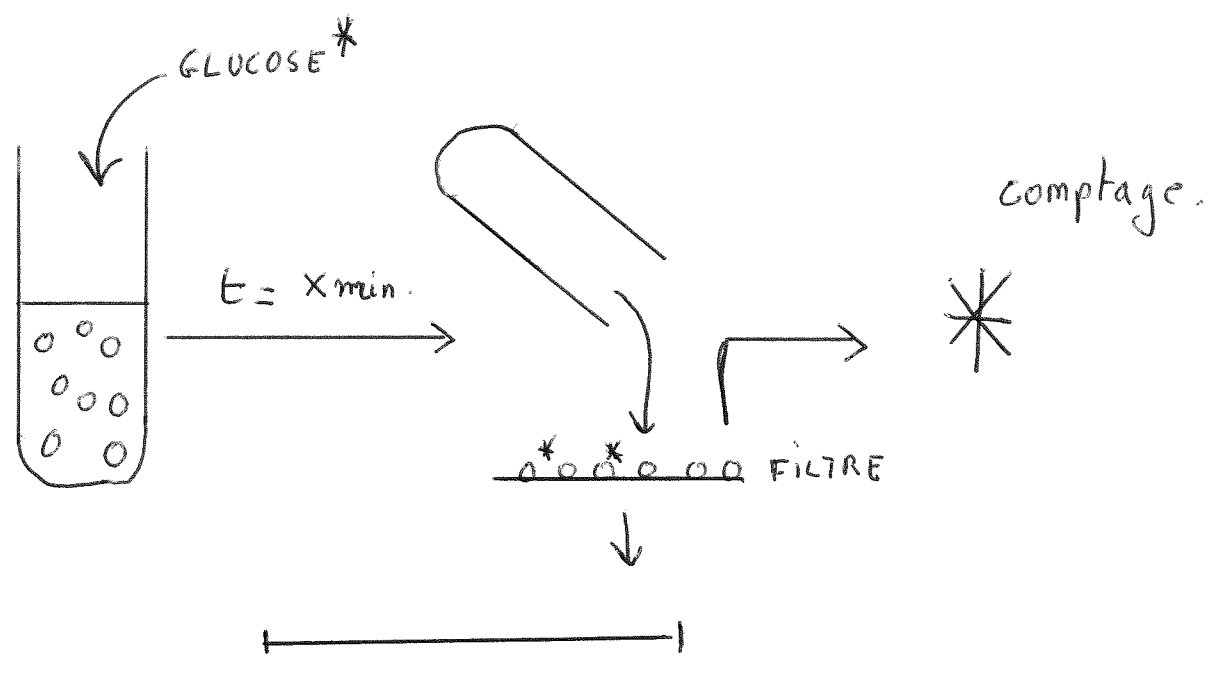
② DDP INTRA q.



③

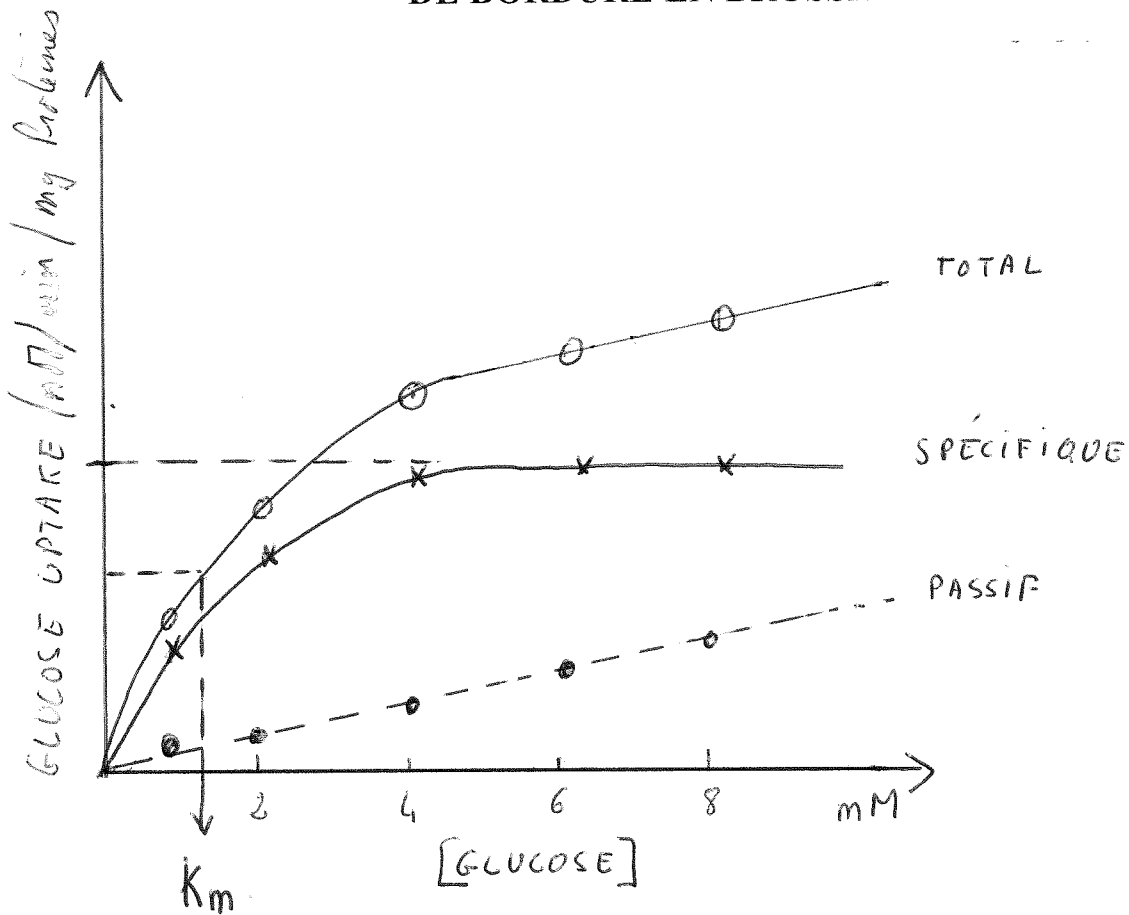
④

TRANSPORT DE GLUCOSE DANS DES VESICULES DE BORDURE EN BROsse



PHENOMENE D'OVERSHOOT.

CINETIQUE DU TRANSPORT DE GLUCOSE DANS DES VESICULES DE BORDURE EN BROSSE



Le transport de glucose spécifique est obtenu en soustrayant le transport passif (en absence de sodium) du transport total

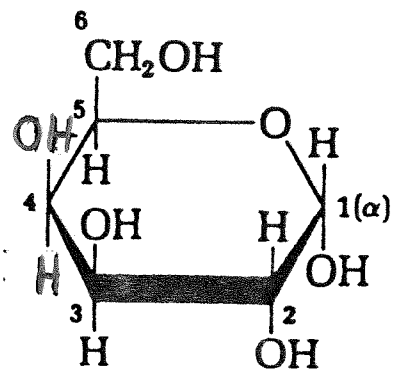
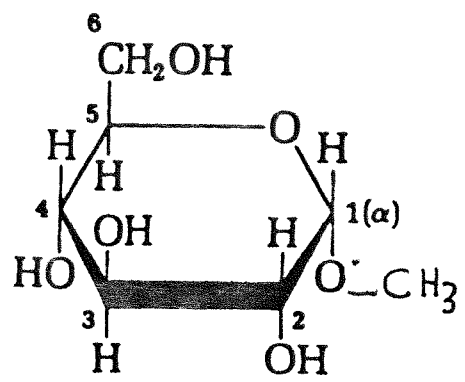
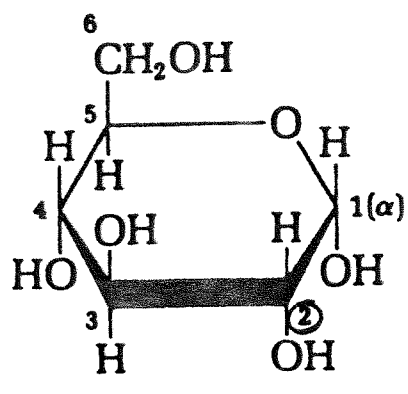
Le transport peut être interprété en terme de cinétique de Michaelis-Menten, la vitesse d'entrée du glucose (v) sera calculée par l'équation suivante :

$$v = V_{\max} \cdot S / K_m + S$$

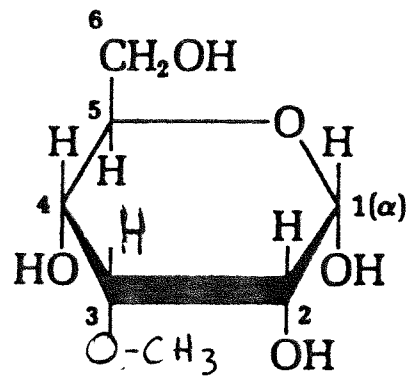
V_{\max} : vitesse maximum de transport

S = concentration du substrat

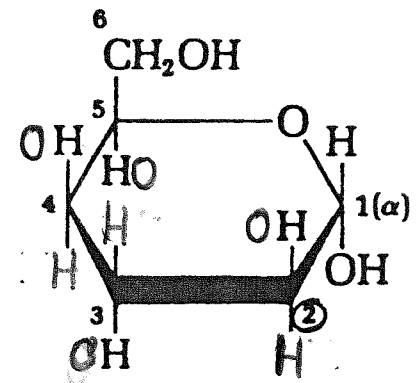
K_m = affinité apparente.



α D-GLUCOSE > α met-GLUCOSE > GALACTOSE >

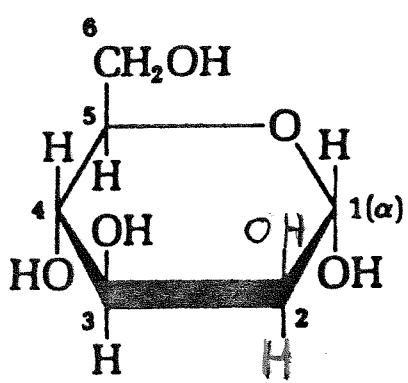


etc....

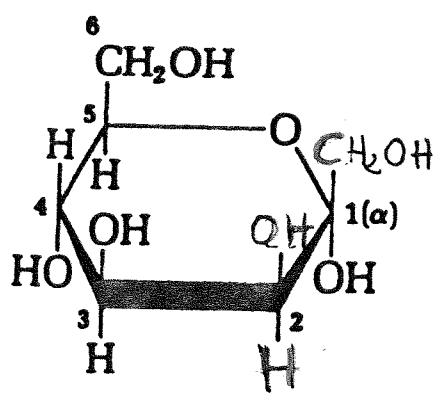


3-O met. GLUCOSE

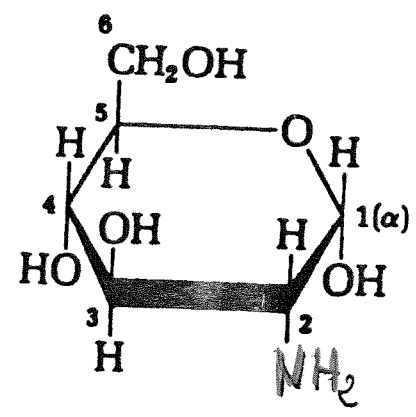
L-GLUCOSE



D MANNOSE

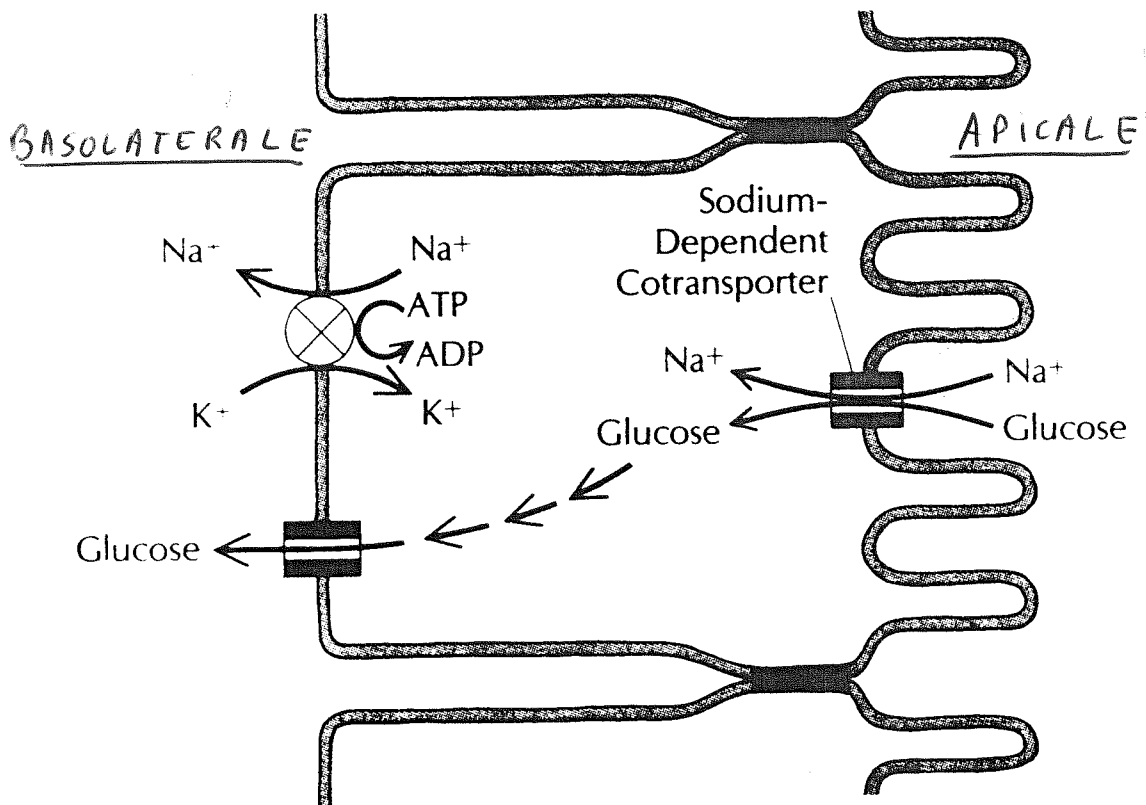


D. FRUCTOSE



GLUCOSAMINE

REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA REABSORPTION DE GLUCOSE PAR LA CELLULE PROXIMALE

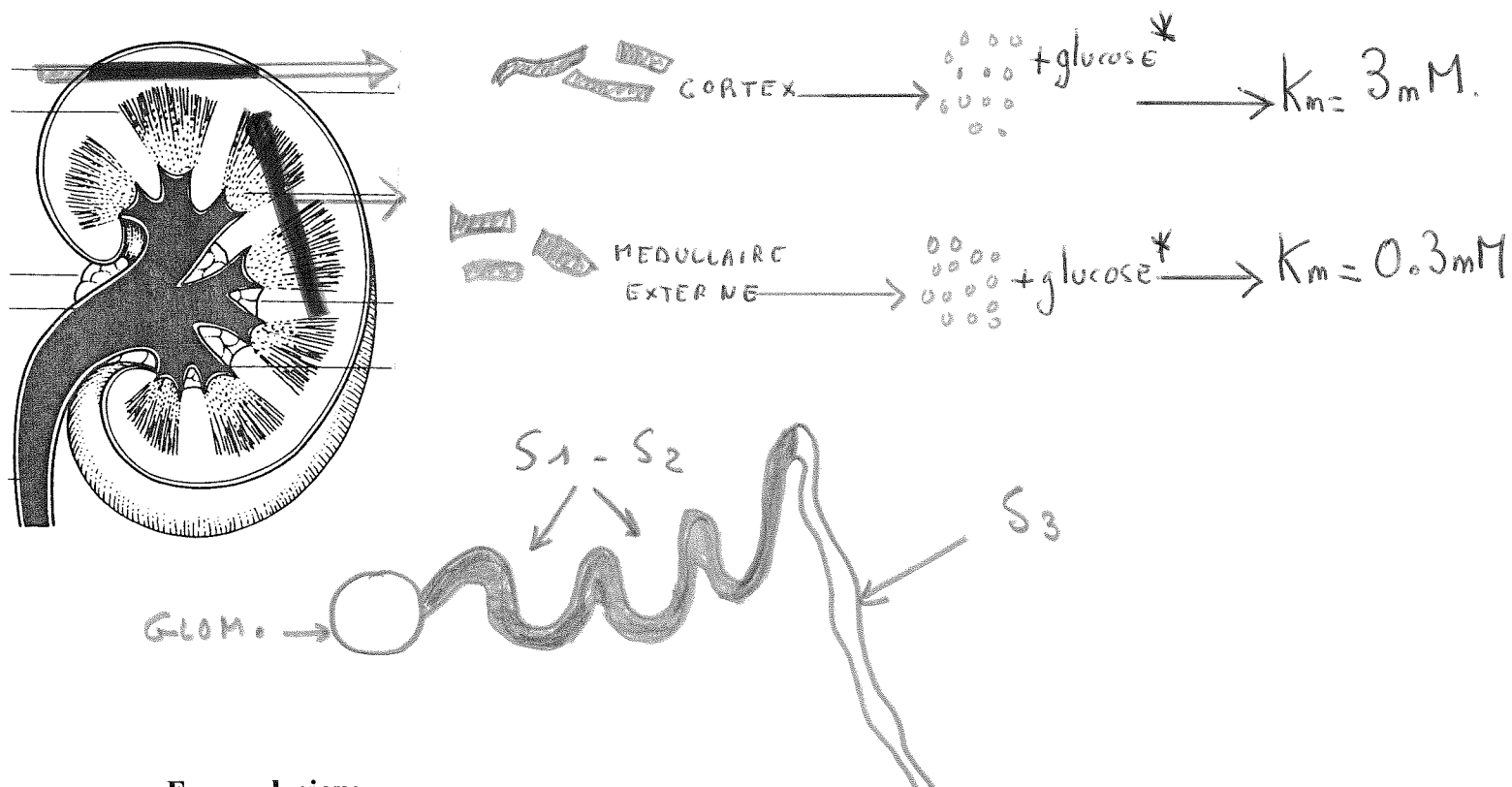


MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DU CO-TRANSPORT Na^+ / D-GLUCOSE

TRANSPORT DE GLUCOSE DANS LA MEMBRANE APICALE

Expériences de Turner et Moran en 1982

Ils préparent des vésicules de bordures en brosse à partir de tranches de **cortex superficiel** et de tranches de **médullaire externe**. Ils mesurent le transport de glucose en présence de Na^+ dans ces deux préparations et établissent les **caractéristiques cinétiques**.



En conclusion:

-Il existe probablement deux systèmes de transport différents sur les deux types de préparation.

- Dans les vésicules provenant du cortex superficiel (principalement composées des parties contournées S1 et S2 du tubule proximal) le co-transport Na^+ / D-glucose est un système à basse affinité avec un K_m de 3mM et une stoechiométrie de 1 Na^+ pour 1 glucose

- Dans les vésicules provenant de la médullaire externe (principalement composées de la pars recta S3 du tubule proximal) le co-transport Na^+ / D-glucose est un système à forte affinité avec un K_m de 0.3mM et une stoechiométrie de 2 Na^+ pour 1 glucose

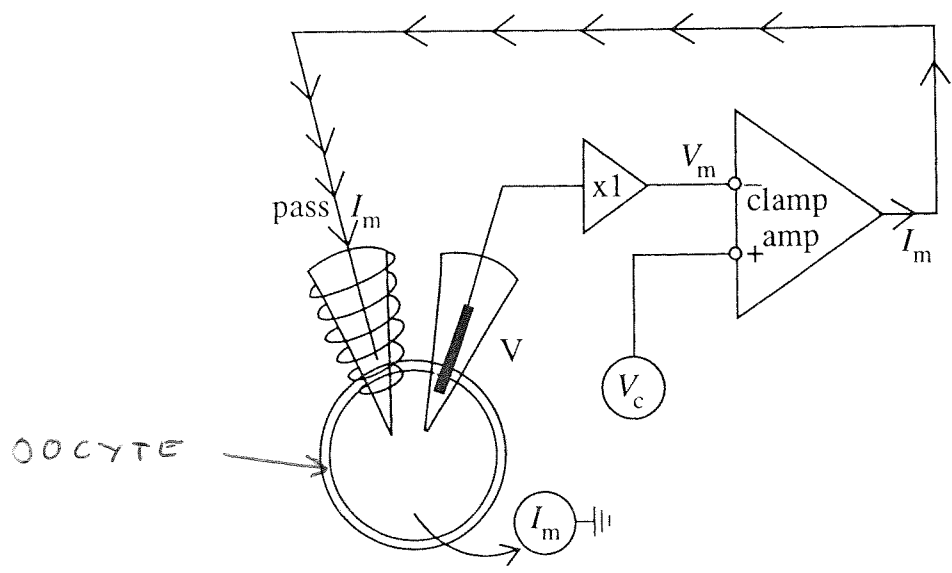
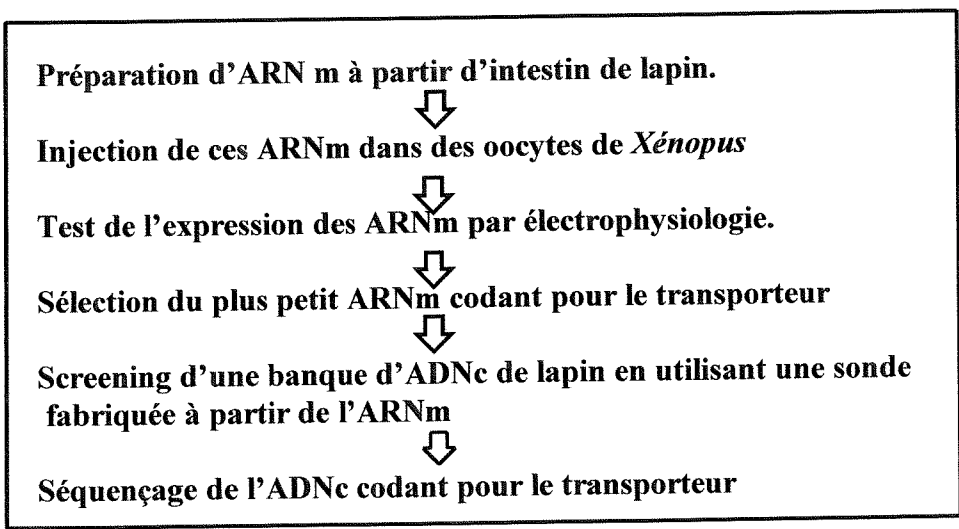
MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DU CO-TRANSPORT Na⁺/ D-GLUCOSE

LE CO-TRANSPORTEUR Na⁺/ D-GLUCOSE À HAUTE AFFINITÉ: SGLT1

En 1987, l'équipe de Wright a cloné le **co-transporteur Na⁺/D-glucose SGLT1** à partir de l'intestin de lapin. Plus tard, d'autres équipes ont montré que l'ADNc codant pour un co-transporteur Na⁺/D-glucose du rein de lapin présente 99% d'homologie avec SGLT1 de l'intestin. Des iso-formes de SGLT1 ont également été trouvées chez le rat et l'homme.

Clonage de SGLT1

Réalisé par expression dans des oocytes de *Xénopus*



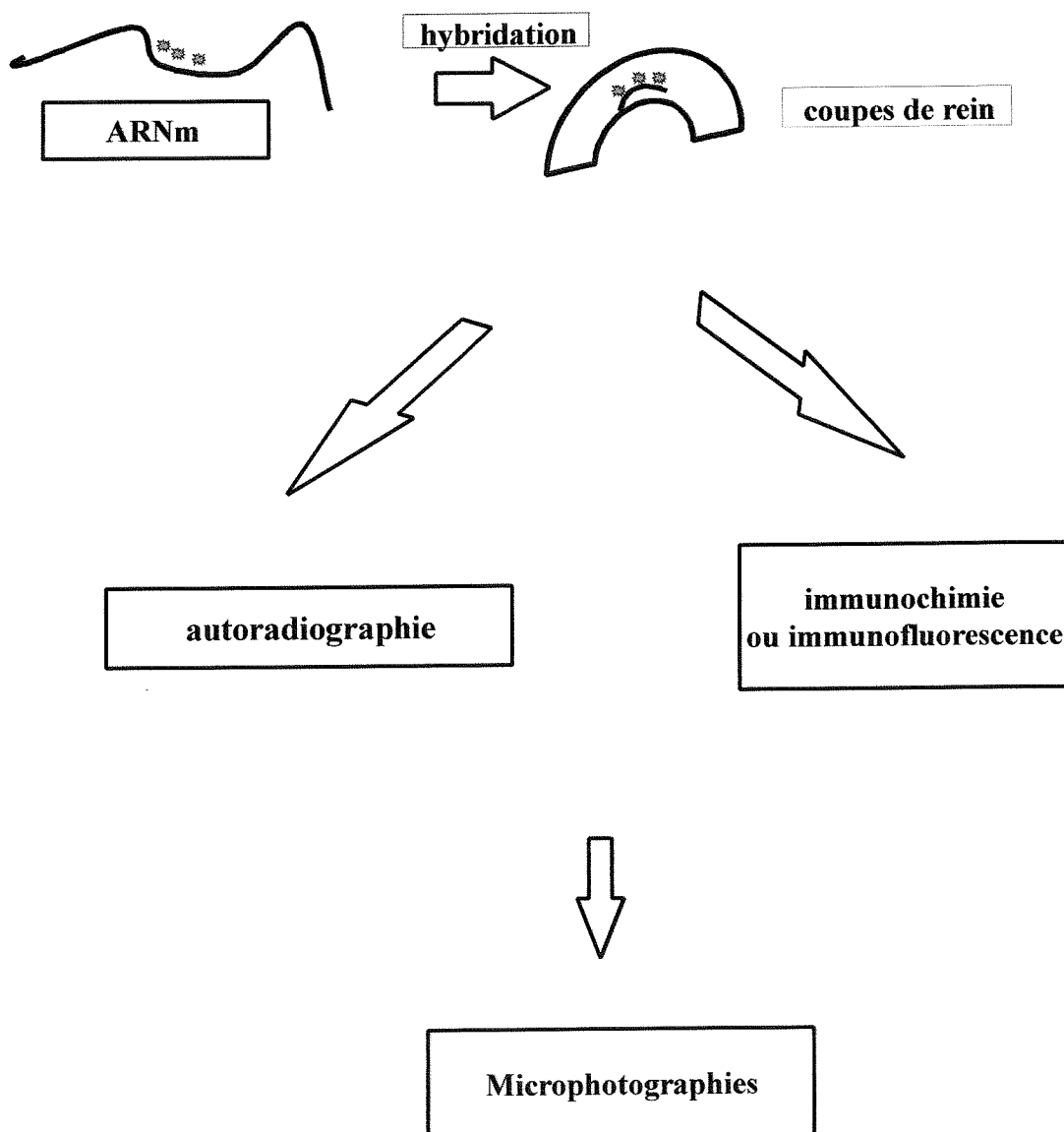
MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DU CO-TRANSPORT Na⁺/ D-GLUCOSE

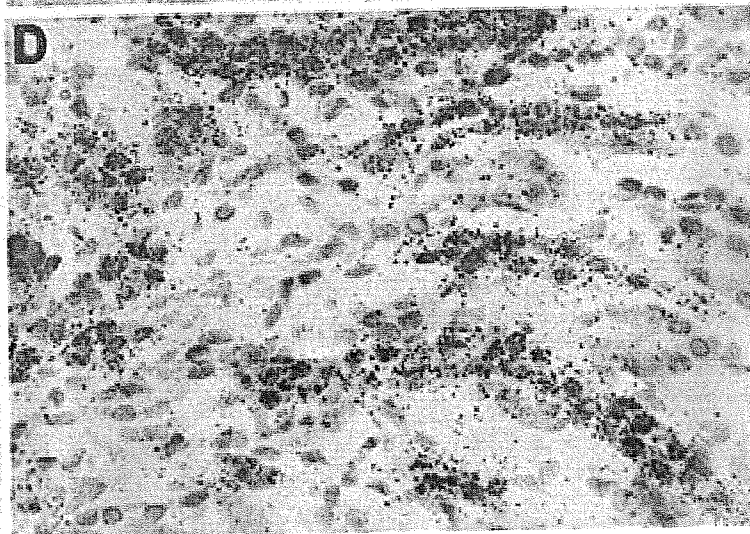
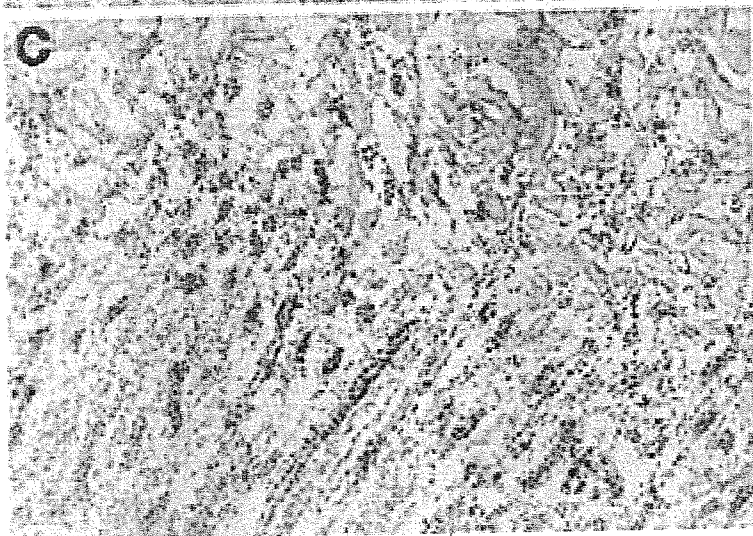
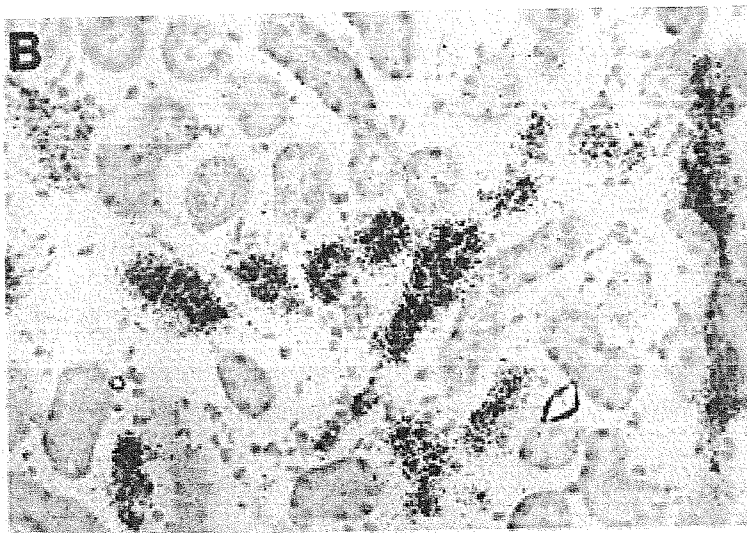
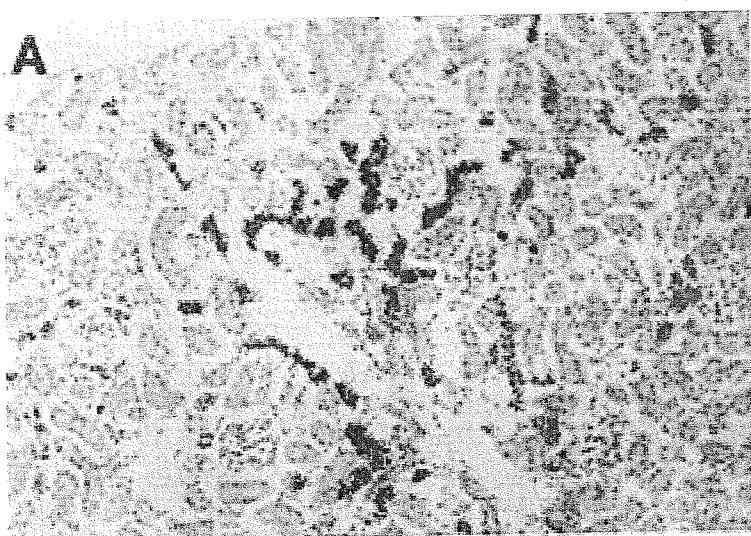
Localisation rénale de SGLT1

Par la technique d'**hybridation *in situ*** il a été montré que SGLT1 est localisé uniquement dans la partie S3 du proximal.

A partir de l'ARN m codant pour SGLT1 on fabrique une sonde qui aura incorporé de **P'UTP marquée au ³²P ou au ³⁵S**. On peut également utiliser un marquage par de **P'UTP digoxigénine DIG** (la DIG est un stéroïde extrait de la digitale, qui se fixe en C5 de l'UTP)

Des coupes semi-fines de rein sont mises à incuber (24 heures) avec la sonde. Après rinçage la sonde est révélée soit par autoradiographie (³²P, ³⁵S) ou par un anticorps anti DIG couplé à la peroxidase ou la phosphatase alcaline.





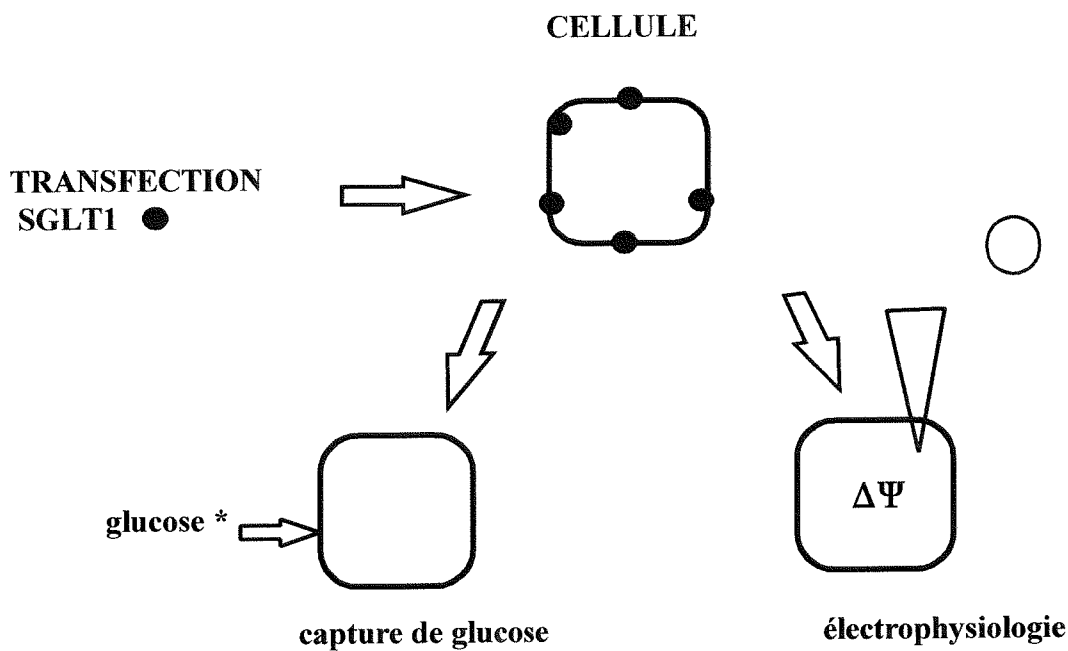
- (A) CORTEX X 20
- (B) CORTEX X 80
- (C) MEDULLAIRE EXT. X 20
- (D) MEDULLAIRE EXT X 400

MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DU CO-TRANSPORT Na⁺/ D-GLUCOSE

Caractérisation fonctionnelle de SGLT1

Réalisée sur des oocytes de *Xénopus* ou sur des cellules de la lignée COS.

Tranfection de l'ARNm ou de l'ADNc codant pour SGLT1 dans les cellules et mesure du transport de glucose couplé au sodium en utilisant du glucose radio-marqué. On peut aussi mesurer le courant généré par le co-transport en utilisant un système de double microélectrodes ou de whole cell clamp.



Dans ces systèmes, l'activité fonctionnelle de SGLT1 est équivalente à l'activité du co-transporteur Na⁺/D-glucose décrit dans l'intestin grêle ou la médullaire externe du rein. I

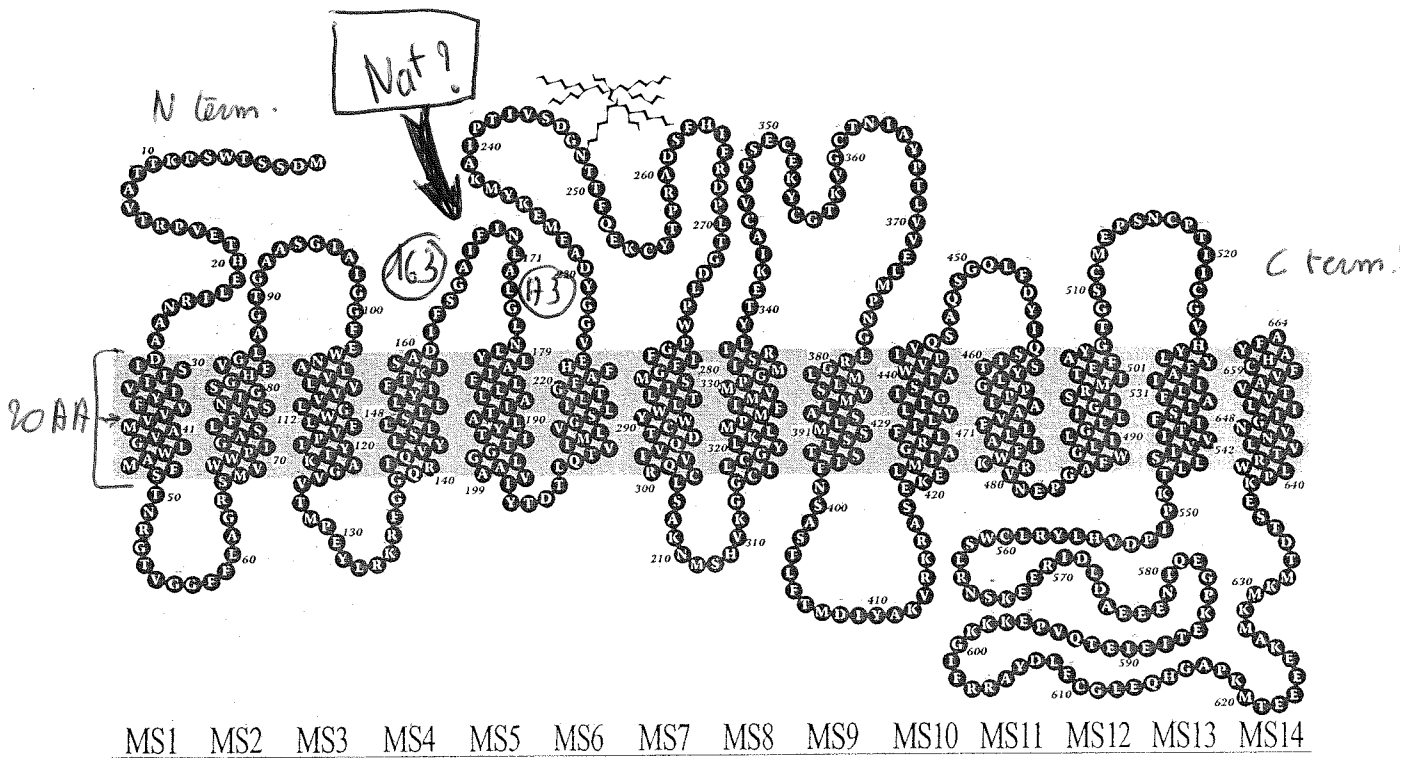


- Il est électrogénique avec une stoechiométrie de 2 Na⁺ pour 1 glucose
- Il est de forte affinité pour le glucose avec un Km de 0.3 mM

MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DU CO-TRANSPORT Na⁺/ D-GLUCOSE

TOPOLOGIE MEMBRANAIRE DU CO-TRANSPORTEUR Na⁺/ D-GLUCOSE À HAUTE AFFINITÉ: SGLT1

La topologie de SGLT1 est basée sur le profil d'hydrophobicité des chaînes d'acides aminés



En étudiant des mutants tronqués il a été démontré que

Le site de liaison du D-glucose se situerait entre les hélices 10 à 14

Le site de liaison du Na⁺ se situerait entre les hélices 1 et 9

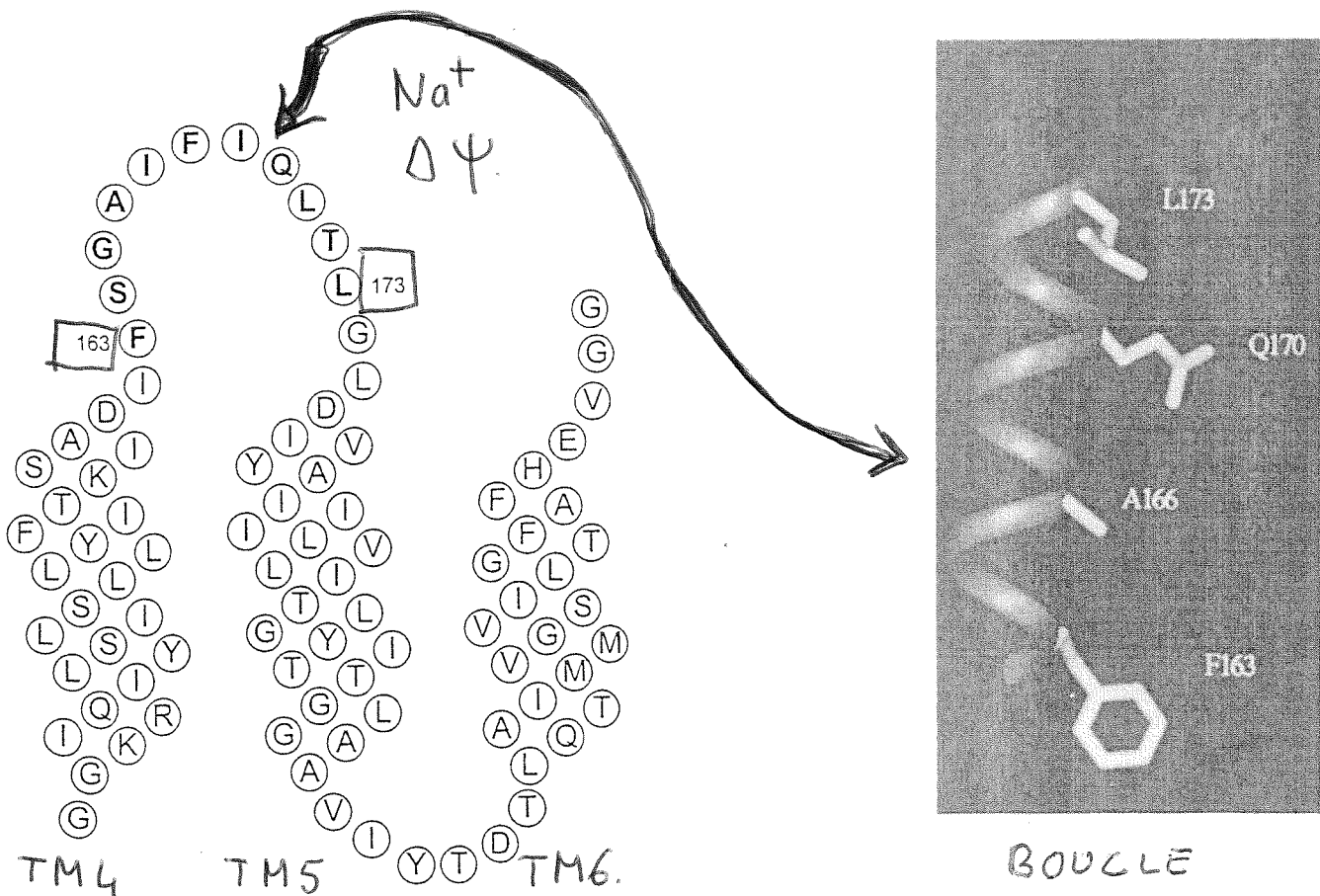
44

MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DU CO-TRANSPORT Na⁺/ D-GLUCOSE

TOPOLOGIE MEMBRANAIRE DU CO-TRANSPORTEUR Na⁺/ D-GLUCOSE À HAUTE AFFINITÉ: SGLT1

SITE DE FIXATION DU SODIUM

Pour déterminer le site on va remplacer par mutagenèse dirigée les acides aminés supposés être impliqués, par des **cystéines**. Les clones ainsi obtenus sont transfectés dans des cellules et on analyse le transport de glucose avec ou sans traitement par des composés dérivés des méthylthiosulfates (MTS) qui réagissent avec les cystéines. La réaction avec des MTS bloque l'accessibilité des sites et modifiera donc la perméabilité si les sites mutés sont nécessaires pour le transport.



DANS LA BOUCLE, ENTRE LES SEGMENT TM4 ET TM5 LES ACIDE AMINÉS 163 (phenylalanine) et 173 (leucine) SONT INDISPENSABLES POUR LA FIXATION DU Na⁺

MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DU CO-TRANSPORT Na⁺/ D-GLUCOSE

LE CO-TRANSPORTEUR Na⁺/ D-GLUCOSE À FAIBLE AFFINITÉ: SGLT2

En 1992, identification dans le rein humain d'un clone d'ADNc présentant 59 % d'homologie avec SGLT1

L'expression de ce clone appelé **SGLT2** dans des oocytes de *Xenopus* indique que le un co-transporteur Na⁺ / **D-glucose** présentant une **affinité de 1.5 mM** pour le glucose et une stoechiométrie de 1 Na⁺ pour 1 glucose mais après analyse plus détaillée il a été montré que ce transporteur était plutôt un transporteur d'acides aminés neutres avec une faible affinité pour le glucose.

SGLT2 existe-il?

En 1995, L'équipe d'Hediger clone à partir de rein de rat une isoforme présumée de **SGLT2** ayant 60 % d'homologie avec SGLT1

SGLT2 est localisé le long des parties S1 et S2 du tubule proximal

Il correspond à un co-transporteur Na⁺ / D-glucose de faible affinité avec un Km pour le glucose de 1.5 à 3 mM.

Il présente une stoechiométrie de 1Na⁺ pour 1 glucose.

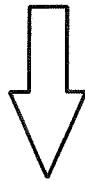
Il pourrait correspondre au transporteur de faible affinité mesuré par Turner et Moran sur des vésicules de cortex

TRANSPORT DU D-GLUCOSE DANS LA MEMBRANE BASOLATERALE

**LE TRANSPORTEUR EST DIFFÉRENT DE CEUX LOCALISÉS SUR LA
MEMBRANE APICALE :**

***C'est un uniport indépendant du Na⁺ et électroneutre**

***Il appartient à la famille des transporteurs de glucose par diffusion facilitée
(GLUT). Il existe deux transporteurs rénaux :**



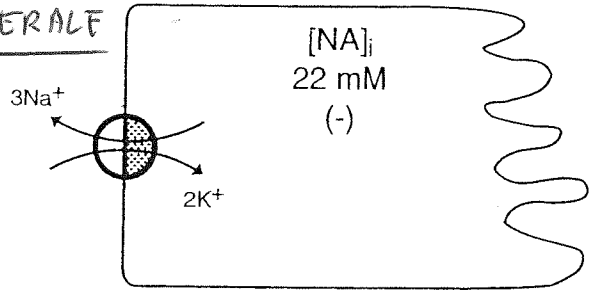
**GLUT 1 est localisé dans la membrane basolatérale des cellules
de la pars recta . Forte affinité pour le glucose avec un Km de 1 à 2 mM**

**GLUT 2 est localisé dans la membrane basolatérale des cellules
du tubule contourné (S1 et S2). Faible affinité pour le glucose avec
un Km de 15 à 20 mM**

ORGANISATION DE LA REABSORPTION DE GLUCOSE LE LONG DU TUBULE PROXIMAL

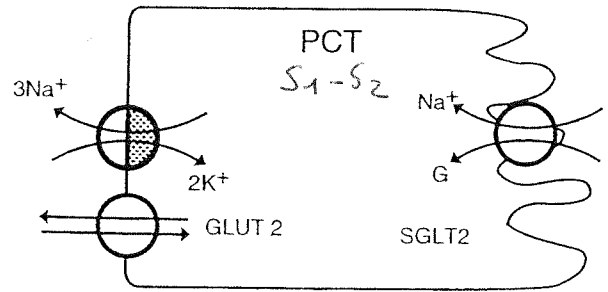
AVANTAGES DES DIFFÉRENTS SYSTÈMES DE TRANSPORT

MB. BASOLATERALE

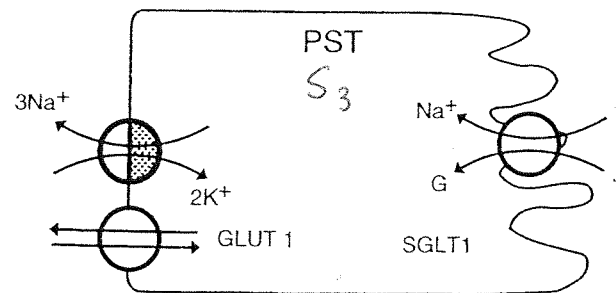


MB. APICALE

[Na]_o
145 mM



[GLUCOSE]_{ext}
= 5 mM à 0.5 mM.
1 Na⁺ / 1 GLUCOSE



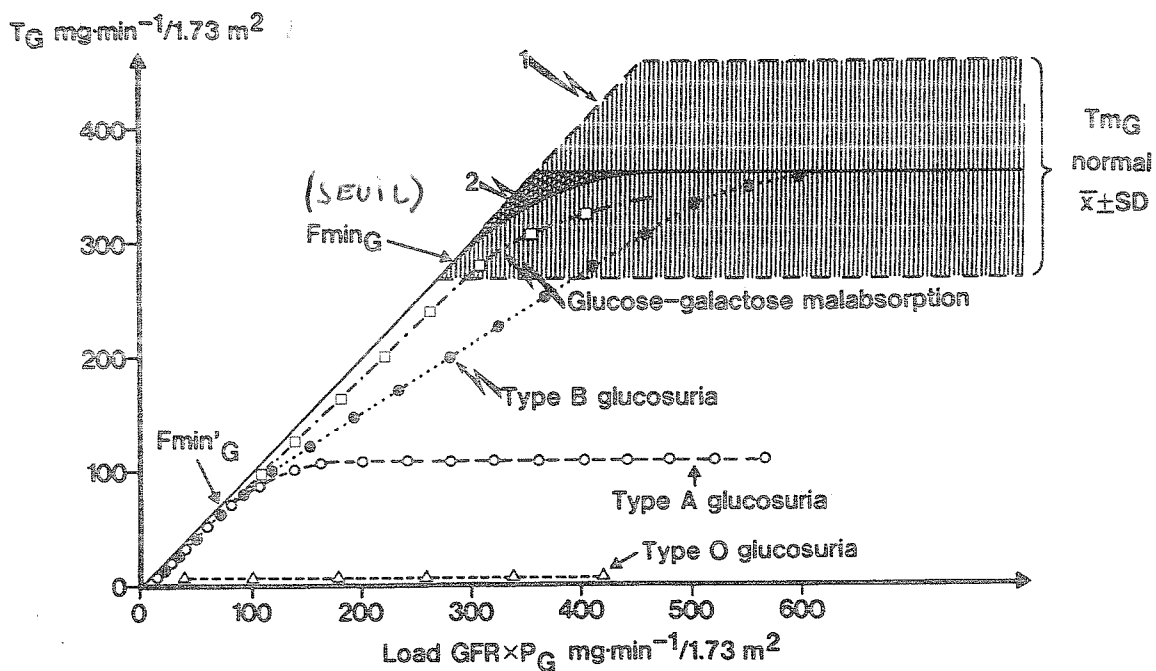
[GLUCOSE]_{ext}
= 1 mM à 0.2 mM.
2 Na⁺ / 1 GLUCOSE

GLYCOSURIES D'ORIGINE RÉNALE

* La glycosurie rénale est généralement un dérèglement bénin qui est caractérisé par la présence de quantités de glucose variables dans les urines en dépit d'une concentration plasmatique normale.

* Dans certains cas les pertes de glucose urinaires peuvent représenter une fraction importante de la charge de glucose filtrée (160g / 24 heures) mais elles peuvent être compensées par une prise alimentaire d'hydrates de carbone.

* Il existe différents types de glycosurie rénale.



* **TYPE A :** réduction du T_m et abaissement du seuil minimum de réabsorption (seuil minimum : charge filtrée ou concentration plasmatique de glucose minimales au dessus desquelles du glucose apparaît dans l'urine)

* **TYPE B :** Le T_m est normal mais le seuil minimum de réabsorption est aussi abaissé.

* **TYPE O :** Aucun transport de glucose.



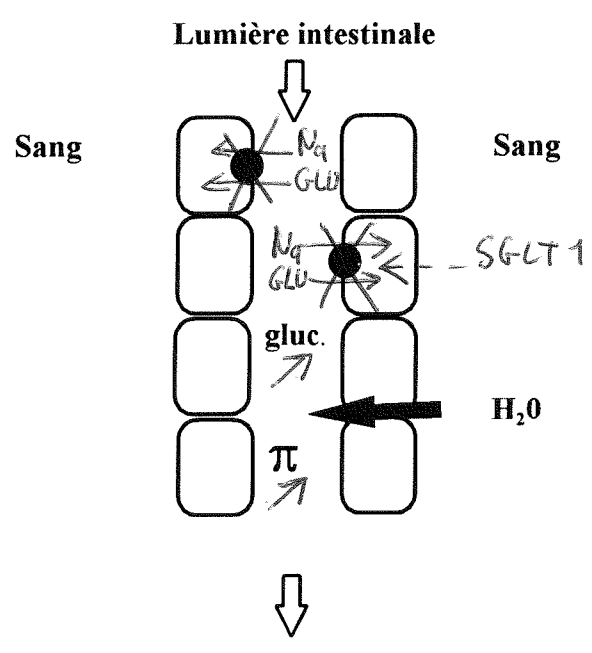
Types A et O sont reliés à un défaut du V_{max} des transporteurs
Type B est relié à un défaut dans l'affinité apparente (K_m)

GLYCOSURIES D'ORIGINE RÉNALE

SYNDROME GGM (Glucose-galactose malabsorption.)

INTESTIN

Ce syndrome familial est du à un défaut du transporteur SGLT1 dans la bordure en brosse de l'intestin. Chez les malades il y a accumulation de sucres intestinaux ce qui cause un flux osmotique en sens inverse induisant des diarrhées sévères qui cèdent lorsque le glucose et le galactose sont supprimés de la diète.



REIN

Au niveau rénal, il existe un syndrome analogue mais à priori plus bénin qui serait du à une mutations ou une altération dans l'expression de la forme SGLT2 du transporteur. Le K_m serait modifié..

PHYSIOLOGIE DE LA CELLULE PROXIMALE

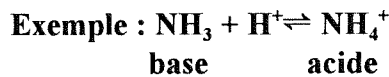
Transport d'acides aminés

CARACTERISTIQUES CHIMIQUES DES ACIDES AMINES

IONISATION DES ACIDES AMINES

Rappel:

Selon Bronstedt un acide est une substance capable de céder des protons (H^+) et une base est capable d'accepter des protons



Chacune de ces substances, pouvant sous une forme céder un H^+ (NH_4^+) et sous une autre forme en capter (NH_3), constitue un couple d'acide base conjugués.

L'équation suivante donne un reflet de la dissociation du couple acide/ base en fonction du pH:

$$pH = pK + \log \frac{[base]}{[acide]}$$

Le pK d'un tel couple représente la valeur du pH pour laquelle la concentration en acide est égale à celle en base.

Cas des acides aminés:

Le pK du couple acide-base, $COOH/COO^-$ varie entre 1.7 et 2.6

Le pK du couple acide-base, NH_2/NH_3^+ varie entre 8.9 et 10.6.

Ceci implique que les AA sont des zwitterions qui portent une charge négative et une charge positive.

A une valeur de $pH = (pK_{COOH} + pK_{NH_2})/2$, l'AA n'a pas de charge nettes (pH isoélectrique, pHi).

Si ce pHi est proche des valeurs de pH physiologiques, la molécule est neutre. C'est le groupe des AA neutres.

Si ce pHi est inférieur aux valeurs de pH physiologiques, la molécule est chargée négativement C'est le groupe des AA "acides ou anioniques".

Si ce pHi est supérieur aux valeurs de pH physiologiques, la molécule est chargée positivement. C'est le groupe des AA "dibasiques ou cationiques".

CARACTERISTIQUES CHIMIQUES DES ACIDES AMINES

STRUCTURE MOLÉCULAIRE

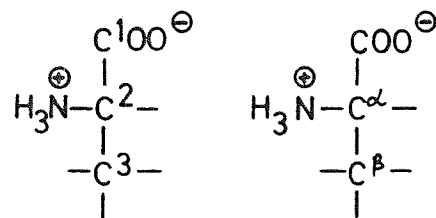
* Un acide aminé (AA) doit posséder au moins un groupe carboxyle (COOH) et un groupe amine (NH₂)

* Les deux groupes sont utilisés pour la liaison d'un AA à un autre dans les chaînes protéiques

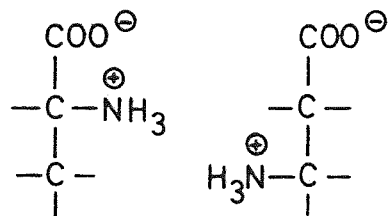
* Dans les AA naturels d'origine animale, le groupe NH₂ est lié au carbone C2 (ou C α, selon l'ancienne nomenclature)

* Excepté pour la glycine, C2 possède quatre ligands différents. Ceci implique l'existence de 2 stéréo-isomères: la forme L qui est l'isomère essentiel de toute matière vivante et la forme D qui se trouve principalement dans les bactéries et les racémiques industriels.

Des études montrent la présence de D-AA (D-serine) dans le plasma ???



L-2-amino acid = L-α-amino acid



D-α-amino acid L-β-amino acid

CARACTERISTIQUES CHIMIQUES DES ACIDES AMINES

ACIDES AMINES NEUTRES

Simple aliphatic

$pH_i \approx 5.5 \text{ à } 6.5$

Hydroxy-containing aliphatic

ω -Amides

Sulfur containing

Aromatic

Secondary ("imino" acids)

Other heterocyclic

β -Amino acids

γ -Amino acids

Others

Glycine (Gly, G)

α -Aminoisobutyric acid (AIB)

Alanine (Ala, A)

Isoleucine (Ile, I)

Leucine (Leu, L)

Valine (Val, V)

Serine (Ser, S)

Threonine (Thr, T)

Asparagine (AspNH₂, Asn, N)

Glutamine (GluNH₂, Gln, Q)

~~Cysteine/Cystine*~~ (CySH/CyS-SCy, C/CC)

Homocysteine/Homocystine

Methionine (Met, M)

Phenylalanine (Phe, F)

Tyrosine (Tyr, Y)

Proline (Pro, P)

3-OH-proline (3-OH-Pro)

5-OH-proline (5-OH-Pro)

5-Oxoproline or "pyroglutamate" (5-oxo-Pro)

Tryptophan (Try, W)

Histidine† (His, H)

Cycloleucine

β -Alanine (β -Ala)

γ -Aminobutyric acid (GABA)

Citrulline (Cit)

δ -(or 5-)Amino levulinic acid

ACIDES AMINES "ACIDES"

$pH_i \approx 3.0$

Aspartate (Asp, D)

Glutamate (Glu, E)

Cysteate

γ -Carboxyglutamate

~~(Cystate)*~~

⊖

ACIDES AMINES "BASIQUES"

$pH_i \approx 10.0$

Arginine (Arg, R)

(Histidine)† (His, H)

Lysine (Lys, K)

Ornithine (Orn)

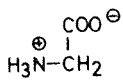
Homoarginine (Homo-Arg)

⊕

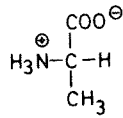
pH_i = pH isoélectrique. C'est la valeur de pH à laquelle la molécule n'a pas de charges nettes.

CARACTERISTIQUES CHIMIQUES DES ACIDES AMINES

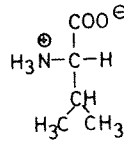
NEUTRES



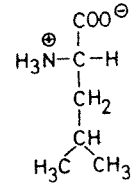
Glycine (Gly)



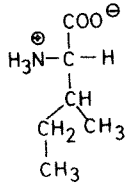
L-Alanine (Ala)



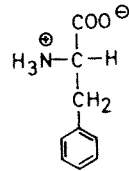
L-Valine (Val)



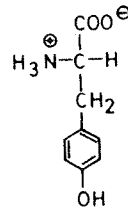
L-Leucine (Leu)



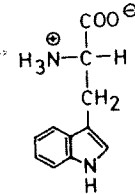
L-Isoleucine (Ile)



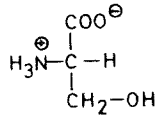
L-Phenylalanine (Phe)



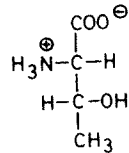
L-Tyrosine (Tyr)



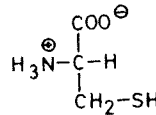
L-Tryptophan (Trp)



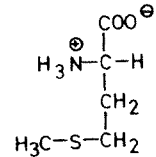
L-Serine (Ser)



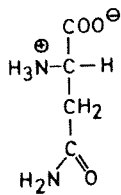
L-Threonine (Thr)



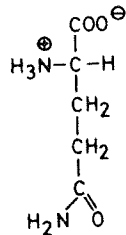
L-Cysteine (Cys)



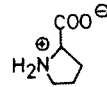
L-Methionine (Met)



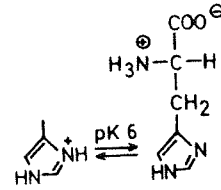
L-Asparagine (Asp·NH₂)



L-Glutamine (Glu·NH₂)

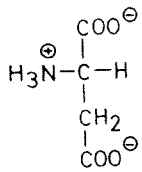


L-Proline (Pro)

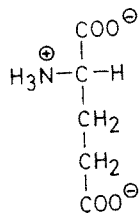


L-Histidine (His)

ACIDES

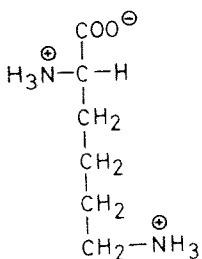


L-Aspartate (Asp)

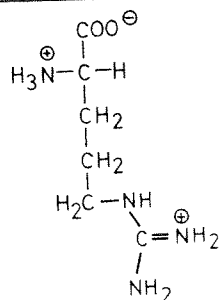


L-Glutamate (Glu)

BASIQUES

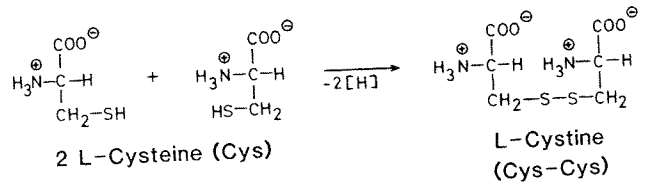


L-Lysine (Lys)



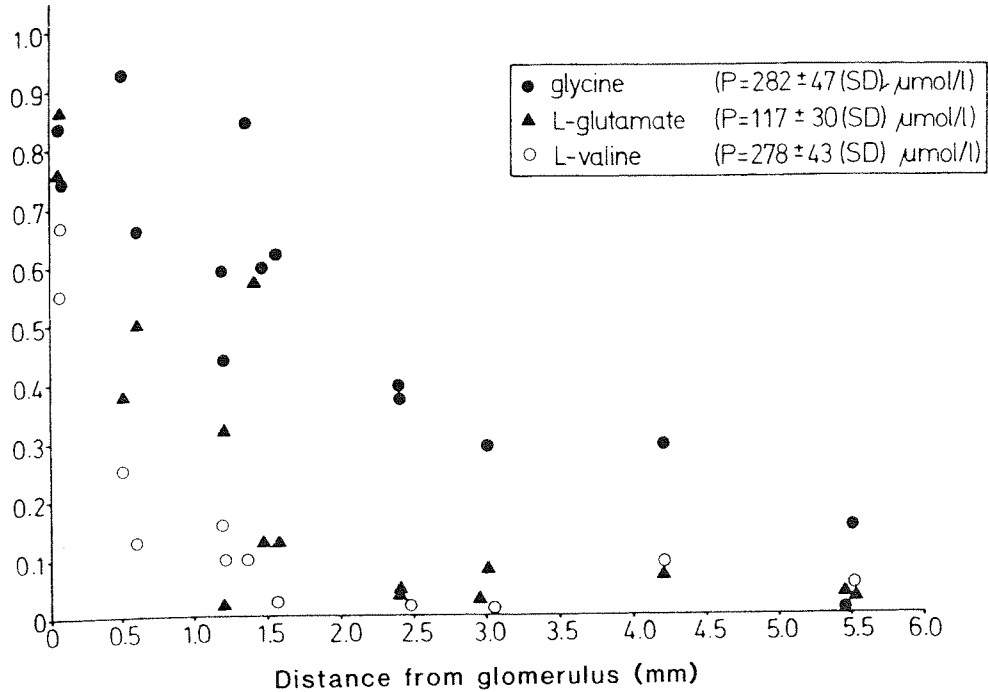
L-Arginine (Arg)

CYSTEINE

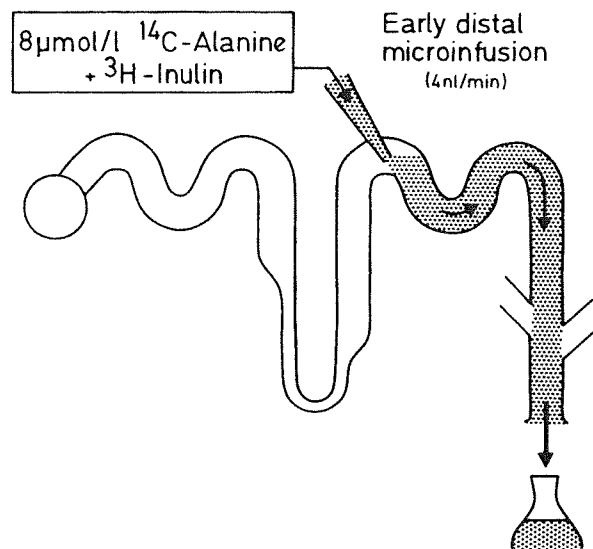


LOCALISATION DES SITES DE REABSORPTION DES ACIDES AMINES

EXPERIENCES DE MICROPONCTIONS



EXPERIENCES DE MICROINJECTIONS



La réabsorption se fait essentiellement le long du tubule proximal

MECANISMES DE REABSORPTION DES ACIDES AMINES

CINETIQUE GENERALE

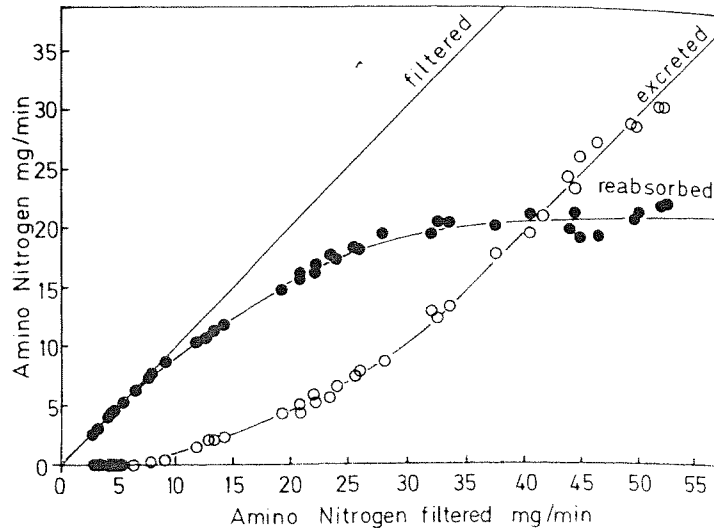


FIGURE 79-6. Quantity of glycine amino nitrogen resorbed and excreted in the dog as a function of the filtered load. Note the wide splay in contrast to Figure 79-5. (Adapted from Pitts RF. A renal reabsorptive mechanism in the dog common to glycine and creatine. *Am J Physiol* 1943;140:156-167, with permission.)

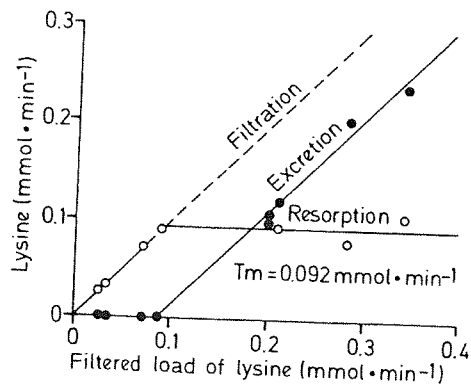
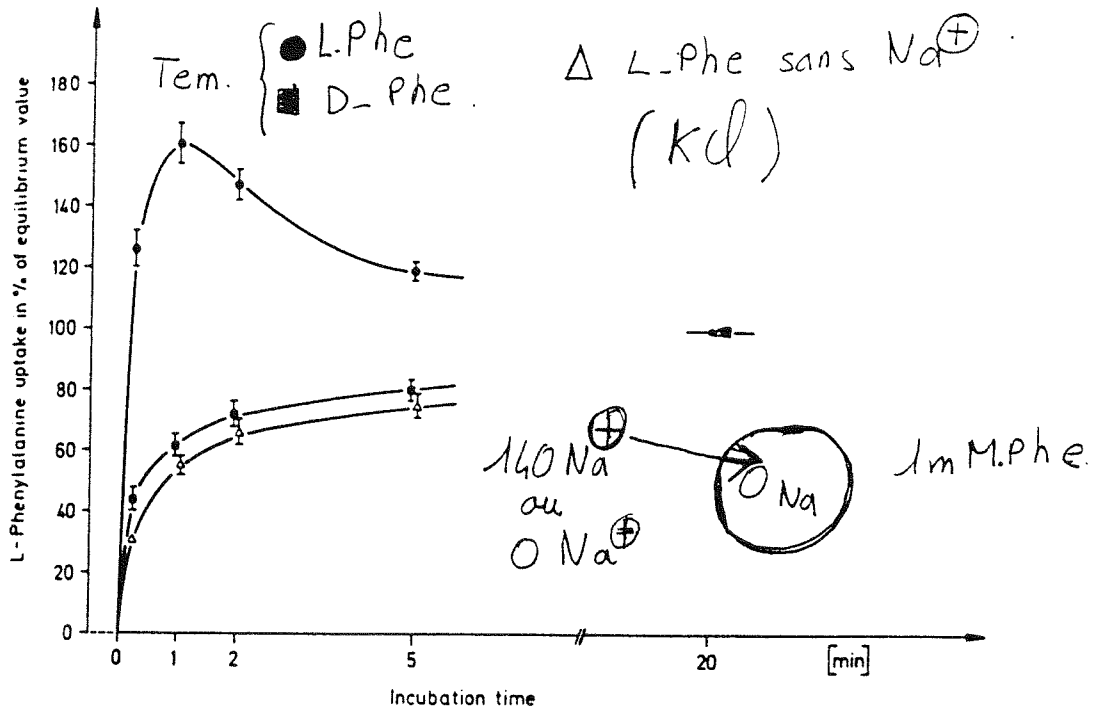


FIGURE 79-5. Quantity of lysine resorbed and excreted in the dog as a function of the filtered load. Note the small splay in contrast to Fig. 79-6. (Adapted from Wright HR, Russo HF, Skeggs HR, et al. The renal clearance of essential acids: arginine, histidine, lysine, methionine. *Am J Physiol* 1947;149:130-134.)

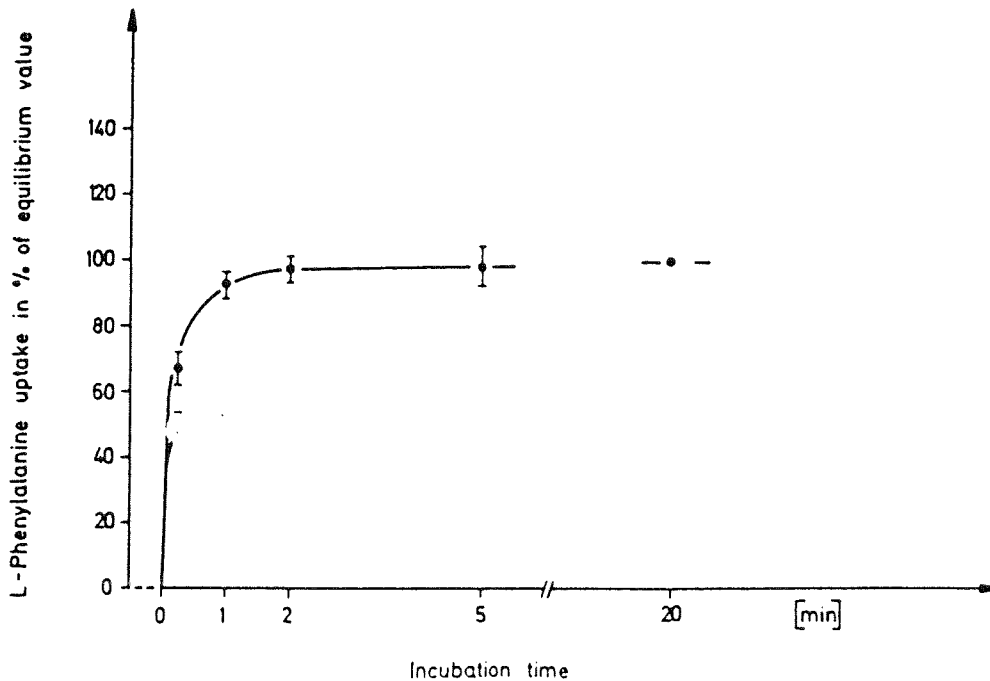
MECANISMES DE REABSORPTION DES ACIDES AMINES NEUTRES

EXEMPLE DE LA PHEHYLALANINE

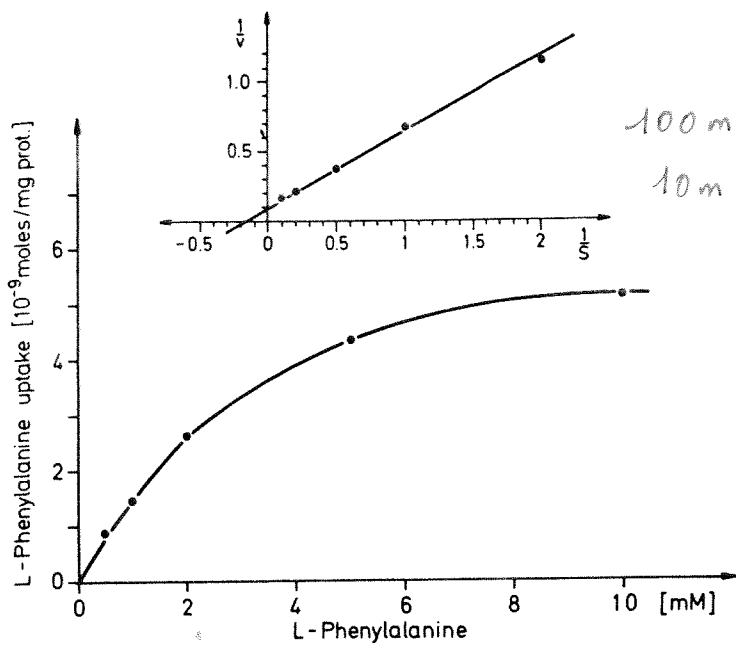
① BBMV



② BLM

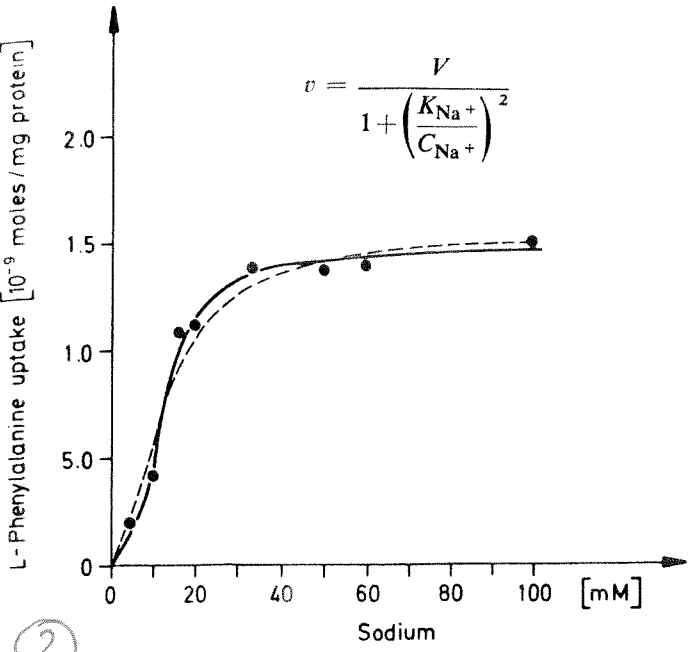


1

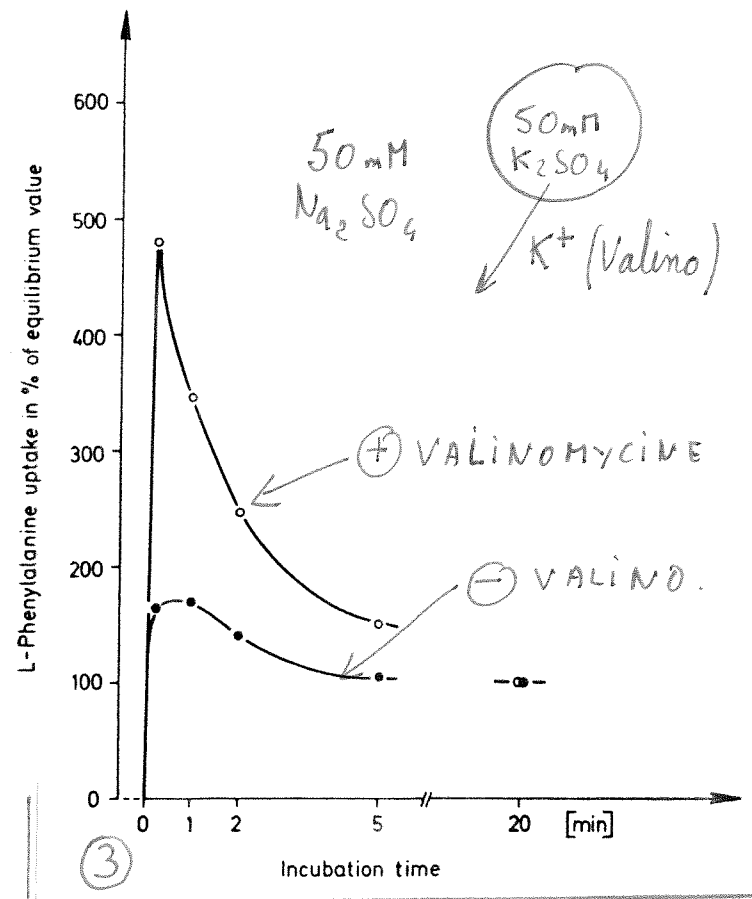


	K _m	V _{max}
100 mM Na ⁺	2.5	2500
10 mM Na ⁺	5.0	2600

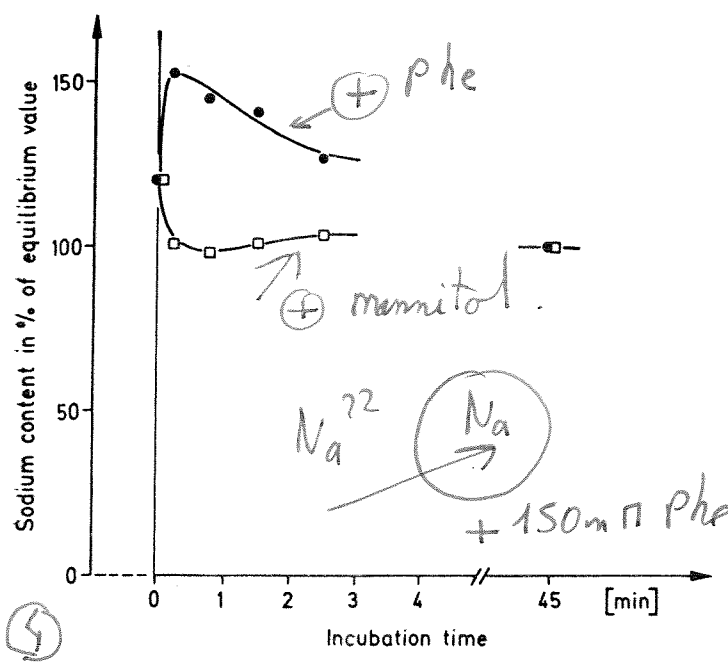
2



3

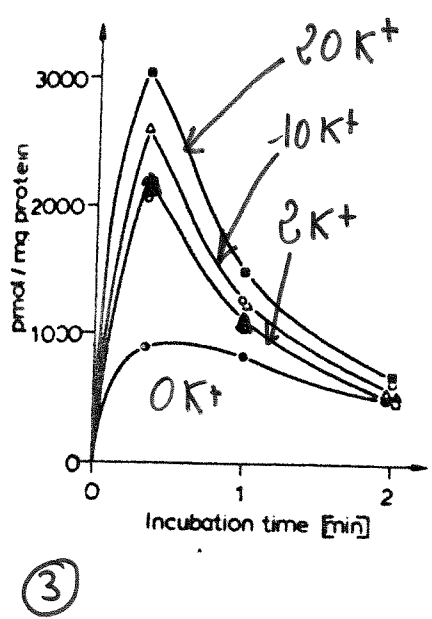
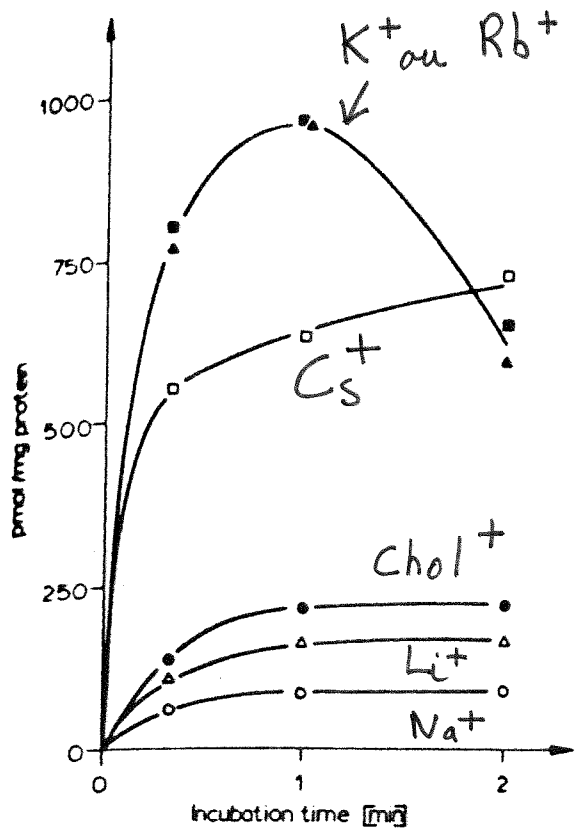
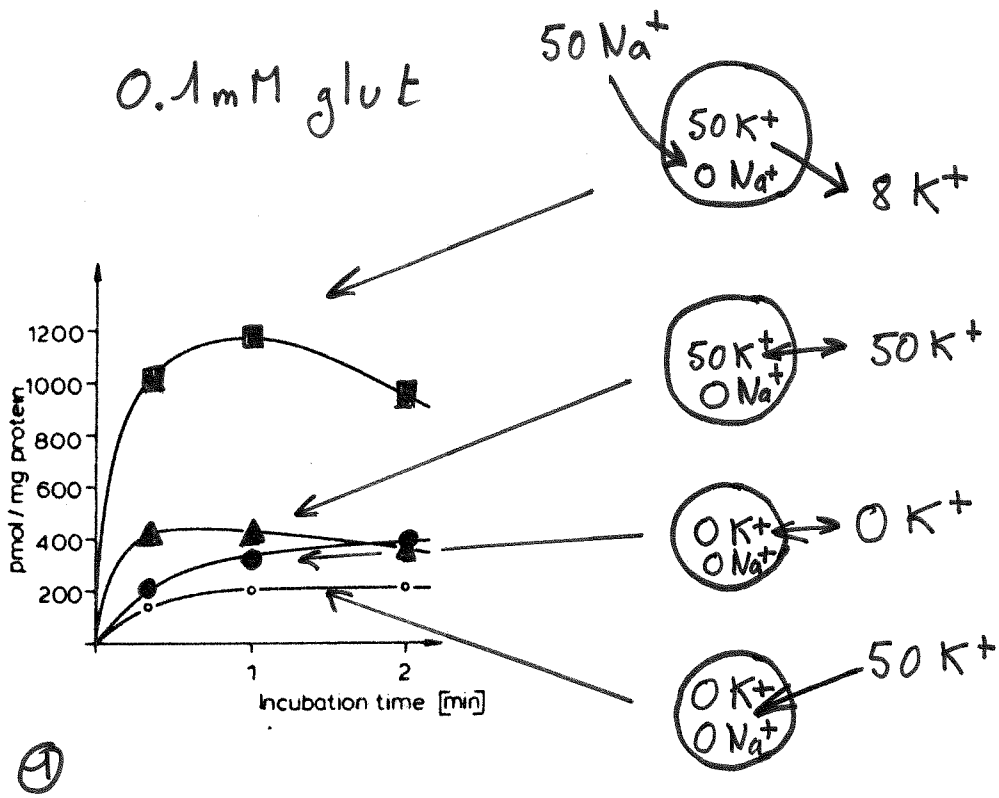


5



MECANISMES DE REABSORPTION DES ACIDES AMINES ACIDES

EXEMPLE DE L'ACIDE GLUTAMIQUE

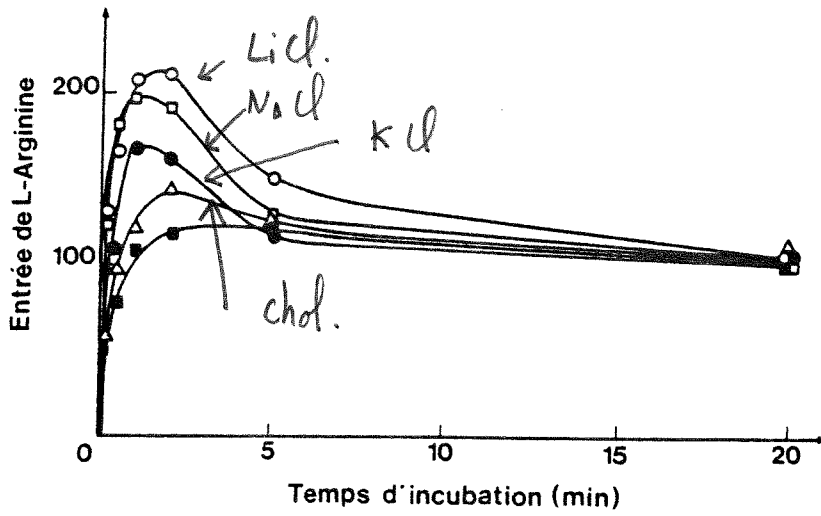


② 50 Na⁺
0 cation

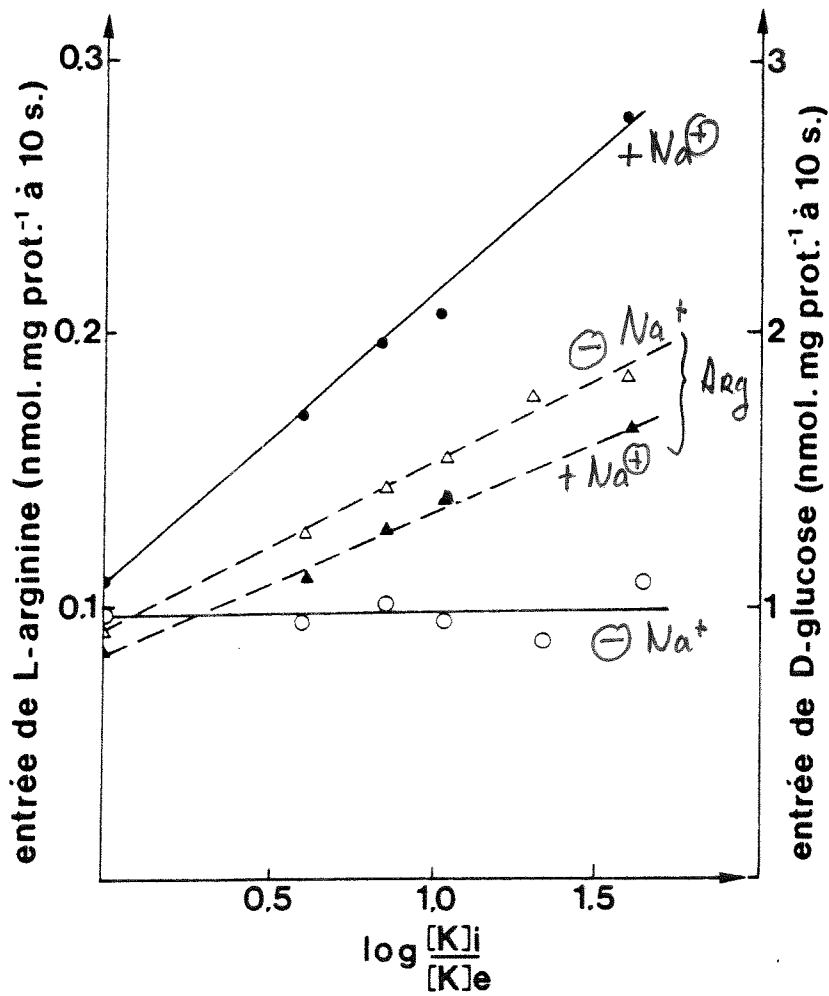
50 cations
0 Na⁺

MECANISMES DE REABSORPTION DES ACIDES AMINES BASIQUES

EXEMPLE DE L'ARGININE

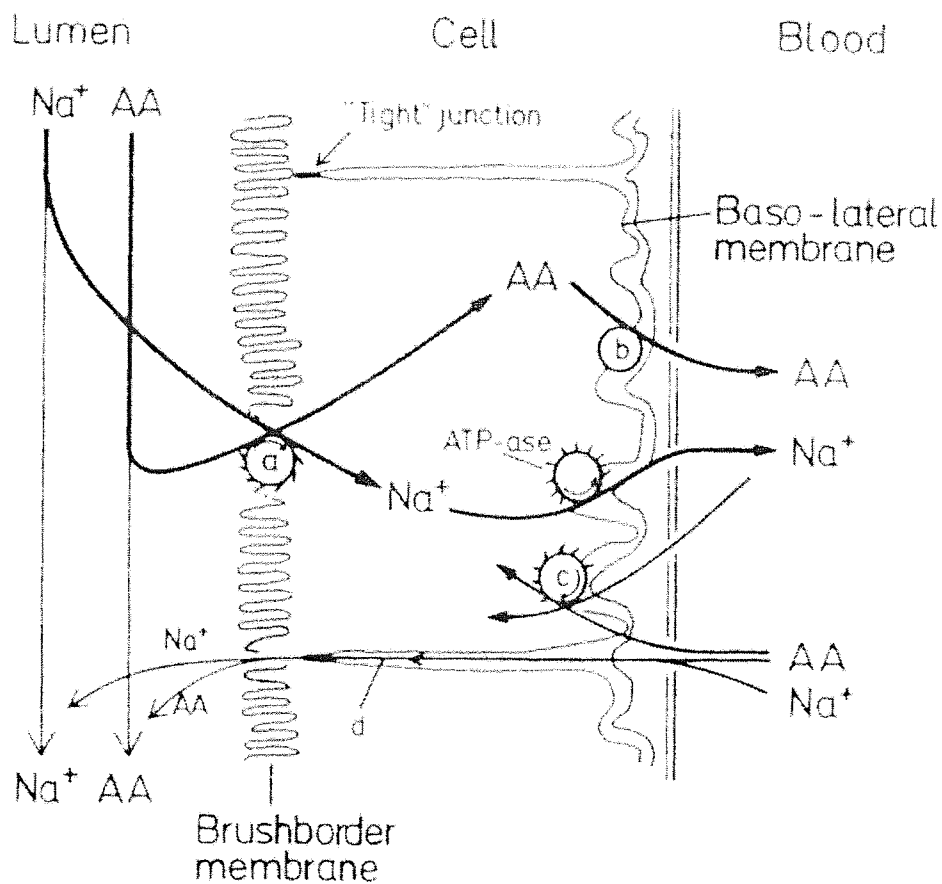


①



MECANISMES DE REABSORPTION DES ACIDES AMINES

SCHEMA DE LA CELLULE PROXIMALE



MECANISMES DE REABSORPTION DES ACIDES AMINES

CLASSIFICATION DES SYSTEMES DE TRANSPORT

TABLE 79-3. SURVEY OF THE DIFFERENT AMINO ACID TRANSPORT SYSTEMS

Na ⁺ -dependent	Type of amino acids	Transport system name	Notes
Yes	Neutral	A	Mainly small amino acids, N-methyl-substrates
		ASC	No N-methyl-substrates
		B	Also aromatic and branched chain amino acids
		Gly	Gly and sarcosine
		N	Gln, Asn, His
No	Cationic and neutral	B ^{0,+}	Analog to ASC (?) Aromatic and branched chain amino acids Favors benzenoid amino acids
	Anionic	X ⁻ _{AG}	
	β-Amino acids	β	
	γ-Aminobutyric acid	GABA	
	Neutral	asc	
		L	
		T	
	Cationic and neutral	b ^{0,+}	
	Cationic	b ⁺	
		y ⁺	
	y ⁺ L	Small neutral amino acids in the presence of Na ⁺ (with low affinity)	
		Small and large amino acids in the presence of Na ⁺ (with high affinity)	
	Anionic	X ⁻ _c	Cystine-glutamate exchange

TABLE 79-4. SURVEY OF AMINO ACID TRANSPORT SYSTEMS AND RELATED CLONED TRANSPORTERS WITH POSSIBLE RELEVANCE IN RENAL AMINO ACID TRANSPORT

Transport system	Tissue distribution	Substrates	Na ⁺ -dependent	Related cloned transporters	Molecular weight (kd)	Transmembrane domains
ASC	Widespread	Small neutral amino acids like Ala, Thr, Ser; also Cys but not cystine; at pH < 5.5 also anionic amino acids	Yes	ASCT1 and 2	56	6-10
b ^{0,+}	Intestine and kidney (brush-border of S ₃ -segment)	Neutral (e.g., cystine) and dibasic amino acids	No	D2, rBAT	78	1/4
β	Renal cortex and medulla	β-Amino acids (e.g. betaine) and taurine	Yes	BGT-1,	74	12
GABA	Brain, liver, kidney	γ-Aminobutyric acid, β-alanine, and partially taurine	Yes	pNCT GAT2 and 3	69 68	12/13 12
Gly	Brain, liver, red blood cells, kidney	Glycine	Yes	Glyt1	71-88	12
X ⁻ _{AG}	Brain, intestine, kidney (brush-border of S ₂ and S ₃ -segment)	Anionic amino acids like Glu and Asp (also D-Asp)	Yes	EAAC-1	57	10
y ⁺	Widespread	Cationic amino acids like Lys, Arg, Orn; His at low pH; small neutral amino acids with low affinity in the presence of Na ⁺	No	CAT-1	67	12/14
y ⁺ L	Widespread	Cationic amino acids; neutral amino acids with high affinity in the presence of Na ⁺	No	4F2hc	85	1

MECANISMES DE REABSORPTION DES OLIGOPEPTIDES

Deux possibilités :

-l'oligopeptide est **hydrolysé en ses AA** constituants et ce sont ces AA qui sont transportés par les systèmes classiques

-L'oligopeptide possède un **système de transport spécifique**.

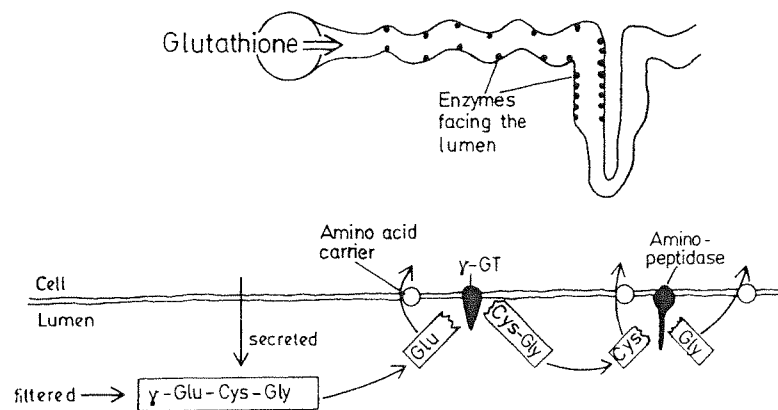
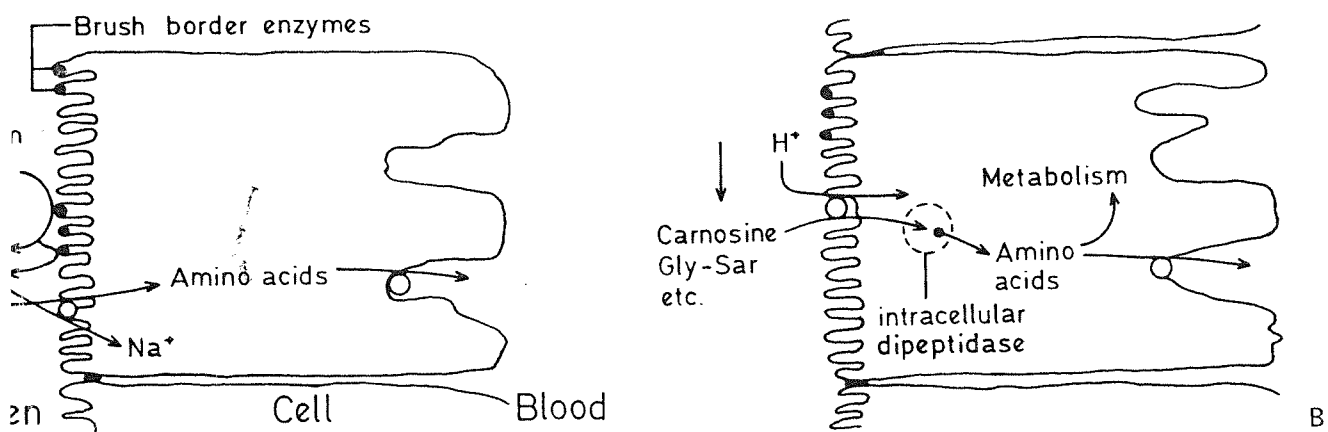


FIGURE 79-16. Hydrolysis of glutathione [and its S-conjugates (Fig. 79-18)] in lumen of proximal tubule by brush-border γ -glutamyltransferase (γ -GT), and, as a second step, by brush-border aminopeptidase and cysteinyl-glycinase. Filtered or secreted glutathione can be resorbed only in form of free constituent amino acids.



Certains di ou tripeptides pourraient être transportés en symport avec des H^+ . Il a été mis en évidence un système à haute affinité ($10\text{-}250\ \mu\text{M}$) et un à plus faible affinité ($>1\text{mM}$). Deux transporteurs H^+ - peptides ont été clonés à partir de rein et d'intestin:

PepT1 et PepT2. Ils codent respectivement pour des protéines de 707 et 728 AA et ont 50 % d'identité. Le profil d'hydrophatie prévoit 12 domaines transmembranaires. Pep T2 a été localisé dans S1 et S2. Son expression dans les ovocytes de Xénope induit un transporteur à haute affinité ($10\text{-}300\ \mu\text{M}$)

PRINCIPAUX MECANISMES DES HYPER-AMINOACIDURIES

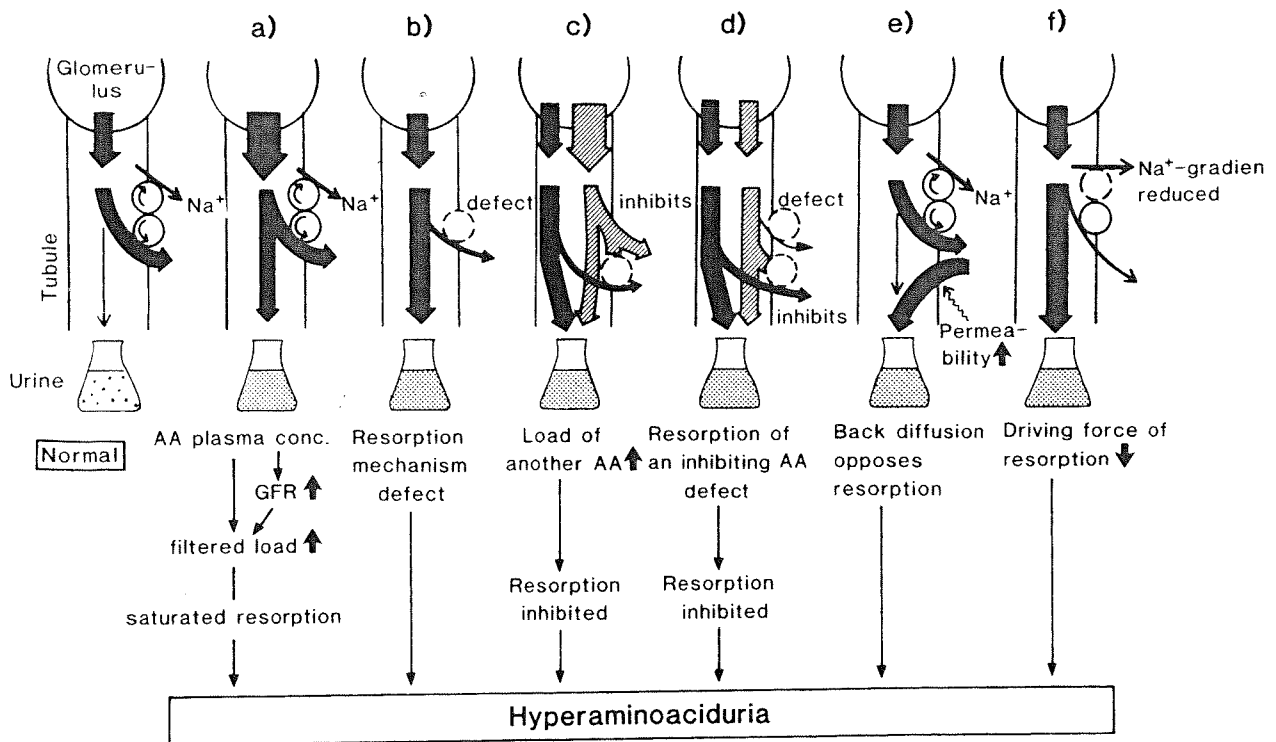


FIGURE 79-14. Scheme of the possible causes of hyperaminoaciduria. **a:** Prerenal hyperaminoaciduria is caused by an elevated filtered load. The plasma amino acid concentration or the glomerular filtration rate is so highly elevated that resorption becomes saturated (Figs. 79-5 and 79-6). **b:** The resorption mechanism (carrier *a* or *b* in Fig. 79-8) has a defect, leading to classic renal hyperaminoaciduria. **c:** The filtered load of another amino acid is elevated, which inhibits resorption of the amino acid originally considered. **d:** Here, an amino acid is not resorbed because its transport mechanism is defective. This amino acid may now inhibit resorption of the amino acid originally considered, although its load is not increased and its transport site is not defective. **e:** In this case, the backleak in the same or in different tubule sections localized downstream is elevated. **f:** In this case, the main driving force, that is, the Na⁺ gradient, is reduced. Not only amino acids but also glucose, phosphate, and other Na⁺ cotransported compounds, as well as Na⁺ itself, are hyperexcreted. Such an unspecific deterioration (e.g., ATP depletion, ATPase inhibition, Na⁺ leakiness) of cell function might lead to a Fanconi syndrome, for example.

DIVERSES HYPER-AMINOACIDURIES

Disorder	Amino Acid Affected	Kidney Site (putative)		Other Organs	Inheritance
		Segment	Membrane		
Cationic aminoacidurias					
Classical cystinuria	Cys, Lys, Orn, Arg	PS	BBM (Type 1)	Intestine	AR
Isolated cystinuria	Cys	PC	BBM	—	AR
Isolated dibasic aminoaciduria	LYS, Orn, Arg	PC/PS	BBM	Intestine	AD
Isolated lysinuria	Lys	PS	BBM	Intestine	AR
Lysine protein intolerance	Lys	PC/PS	BLM	Hepatocyte Fibroblasts	AR
Neutral aminoacidurias					
Hartnup disorder	Neutral amino acids (excluding imino acids and glycine)	PC	BBM	Intestine	AR
Isolated methioninuria	Meth	P	?	—	AR
Isolated histidinuria	Hist	P	?	—	AR
Iminoglycinuria dicarboxylic	Pro, OH-Pro, Gly	PC	BBM	Intestine	AR
	Glut, Asp	PC	BBM	—	AR
Fanconi syndrome					
Idiopathic				—	AR/AD
* Cystinosis				Widespread	
Hereditary fructose intolerance				Widespread	AR
Galactosemia				Widespread	AR
Hereditary tyrosinemia				Widespread	AR
Wilson's disease				Widespread	AR
Lowe syndrome				Eye/brain	
Dent disease				X-linked	R
Cytochrome C-oxidase deficiency				AR	
Busby syndrome			Muscle		AR
Renal glycosuria	D-Gluc	PS	BBM	—	AR
Glucose-Galactose Malabsorption	D-Gluc, D-Gal	PC	BBM	Intestine	AR

PC, proximal tubule (S₁, S₂); PS, proximal tubule (S₃); BBM, brush-border membrane; BLM, basolateral membrane; AR, autosomal recessive; AD, autosomal dominant.

PHYSIOLOGIE DE LA CELLULE PROXIMALE

TRANSPORT DES PROTEINES

TRANSPORT DES PROTEINES

L'albumine et immunoglobulines: du fait de leur poids moléculaire élevé seule une très faible quantité est filtrée et la réabsorption est très faible.

Les protéines de plus faibles poids moléculaire (LMW): constituent un groupe très hétérogène concerné par la filtration et la réabsorption.

La réabsorption(pour les protéines non hydrolysées en AA) se fait essentiellement par endocytose. Les puits à clatherine (coated pits) font partie du système endocytotique:

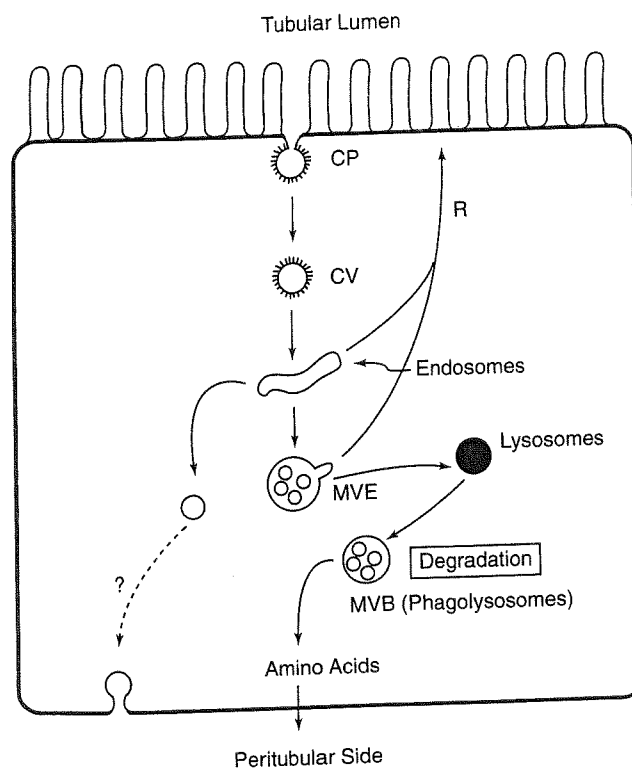


FIGURE 81-4. Schematic representation of endocytic uptake and metabolism of filtered proteins by proximal tubular cells. Filtered proteins are absorbed via clathrin-coated pits (CP) at the luminal membrane, and segregated initially in coated endocytic vesicles (CV). These vesicles lose their coat, migrate to the cell interior, fuse with each other, and become endosomes and multivesicular endosomes (MVE). Multiligand receptors or constitutive membrane proteins in coated pits and the adsorbed filtered proteins are dissociated by the acid milieu of endosomes. The endosomes containing the absorbed protein fuse with lysosomes (L) to constitute the multivesicular bodies (MVB) or phagolysosomes. The multiligand receptors or binding proteins are recycled to the cell surface (R). Digestion of the absorbed protein takes place within the MVB. The products of hydrolysis (amino acids) permeate the MVB membrane, cross the contraluminal cell membrane, and return to the circulation. The dotted arrow and question mark indicates a putative pathway for transcellular transport of absorbed proteins.

TRANSPORT DES PROTEINES (suite...)

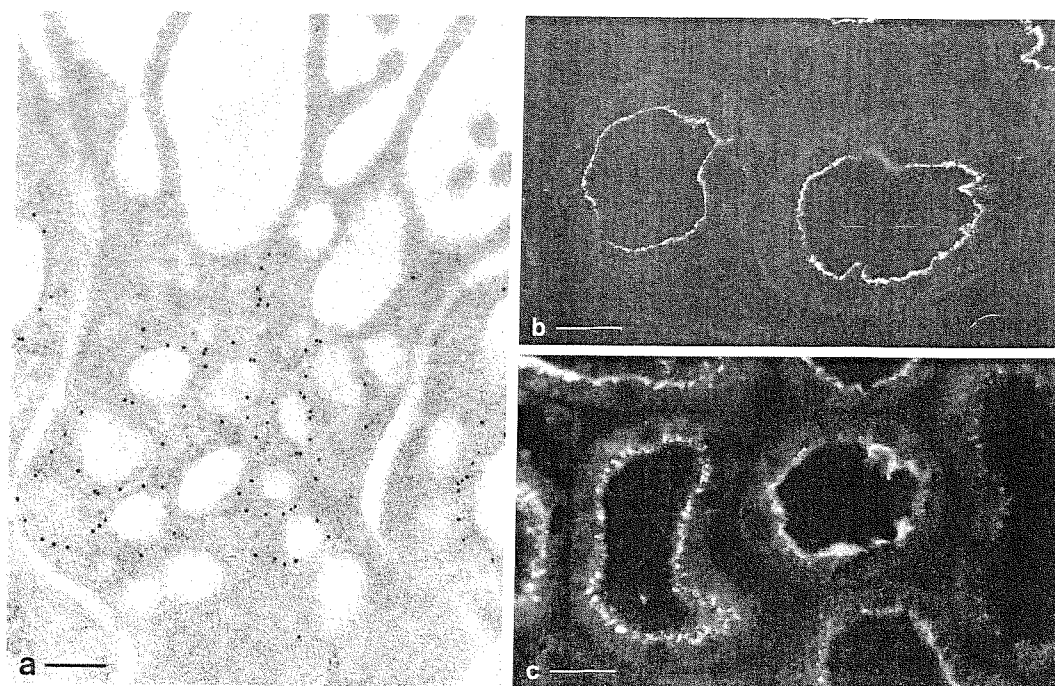


FIGURE 24-5. The apical endocytotic apparatus of the proximal convoluted tubule. **a:** This membrane domain contains many clathrin-coated invaginations and vesicles, shown by immunogold labeling with anticlathrin antibodies. **b:** The extensive subapical clathrin coat of the proximal tubule is clearly revealed by immunofluorescence. **c:** The active endocytosis of the luminal fluid phase marker, FITC-dextran, into the apical endocytotic apparatus of the proximal tubule. Apical endosomes are extensively labeled with this probe. Bar = 0.5 μm (A); 25 μm (B,C).

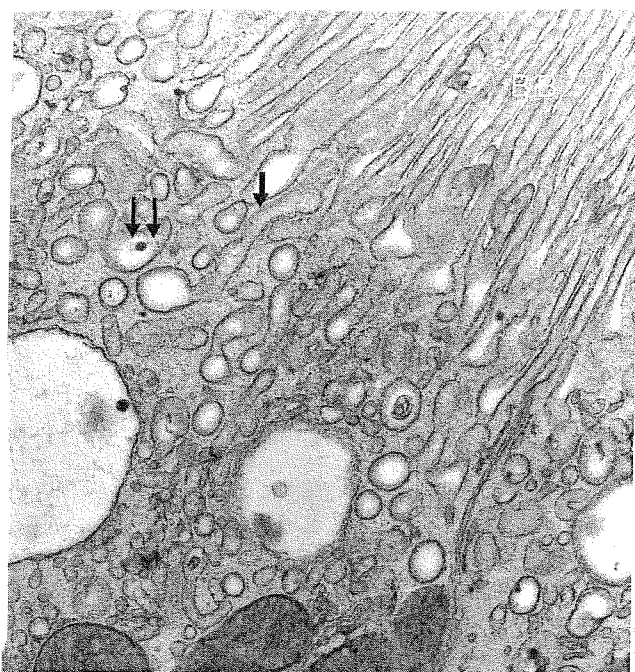
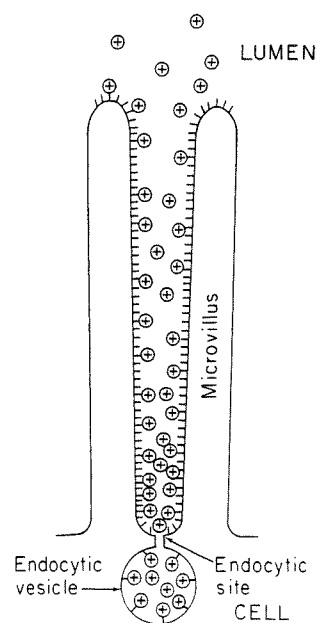


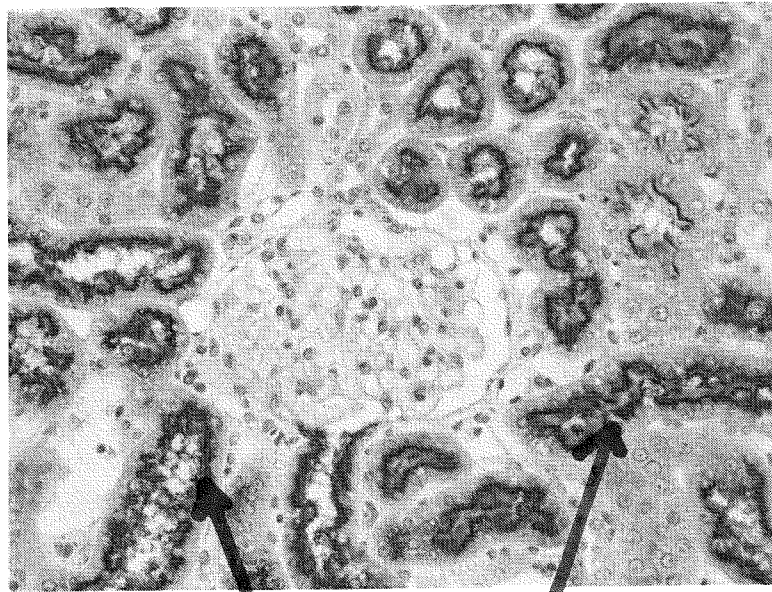
FIGURE 80-6. Slightly oblique section through the apex of a proximal tubule cell (S_2 segment) below the brush border (BB), showing the normal appearance of the endocytotic apparatus made of vesicles of different sizes (endosomes) and dense apical tubules (arrows). Fixation by perfusion with 2.5% glutaraldehyde in barbital buffer, citrate calcium, and postfixed with imidazole/osmium and lead/copper citrate stain. Magnification: $\times 27,000$.



TRANSPORT DES PROTEINES (suite...)

Les puits de clathrine contiennent beaucoup de mégaline. La mégaline est une glycoprotéine de la famille des récepteurs LDL (low density lipoprotein). La mégaline est impliquée dans le transport de certaines protéines. La cubiline est également impliquée.

La fixation du ligand (protéine) sur la mégaline ou la cubiline induit l'endocytose à partir du coated pit:



MEGALINE dans le TP

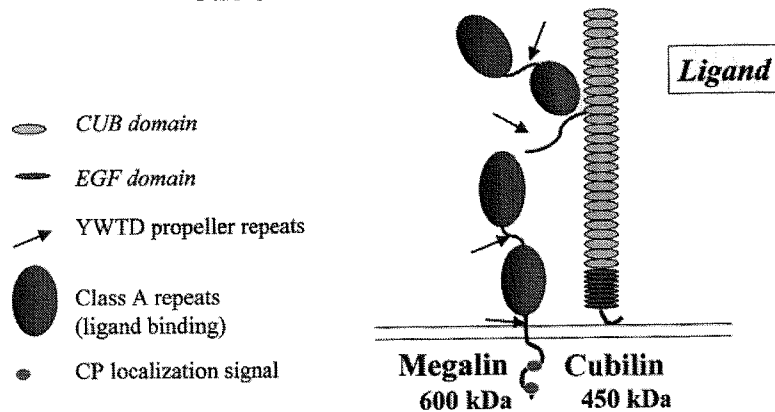


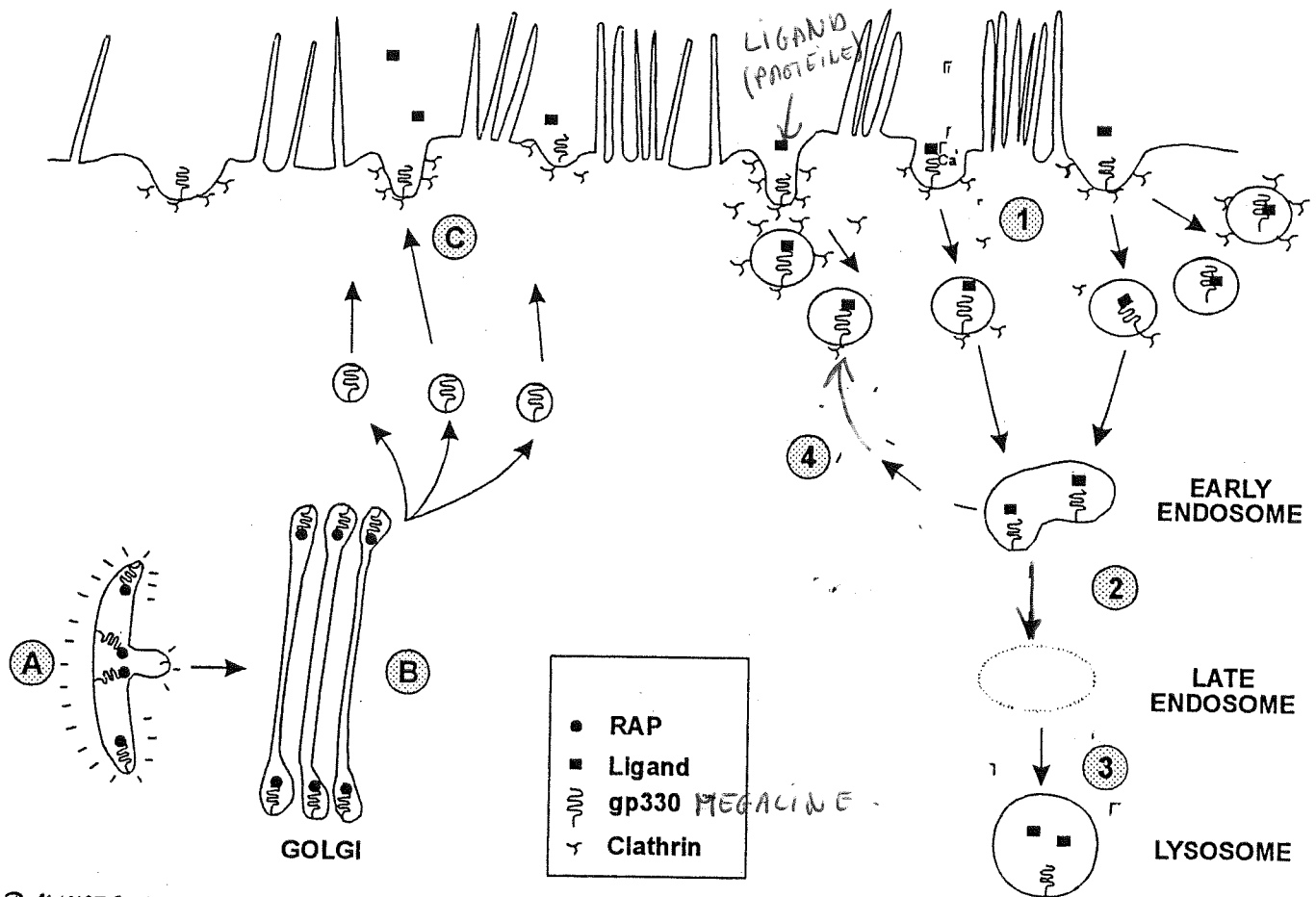
Fig. 4. Schematic presentation of the two endocytic receptors, megalin and cubilin.

Table 1. Ligands to megalin and cubilin

Common to megalin and cubilin	Cubilin specific	Megalin specific
DBP	Clara cell secretory protein	Transcobalamin-vitamin B ₁₂
Ig light chains	Apolipoprotein A-I	RBP-vitamin A
Haemoglobin	Transferrin	Apolipoprotein H
Albumin	HDL	α_1 -Microglobulin
	IF-vitamin B ₁₂ complexes	Transthyretin
	RAP	α -Amylase
		PTH
		Peptide hormones
		UPA-PAI-I
		Ca ²⁺
		Apo-B
		LPL
		RAP

TRANSPORT DES PROTEINES (suite...)

SYNTHESIS (A, B, C) AND RECYCLING (1-4) OF MEGALIN



P. MAYERS 96

FIGURE 80-9. Schematic representation of the *de novo* synthesis pathway (A-B-C) and the recycling pathway (1-4) of megalin. .. Megalin and RAP, its associated protein, which acts as a chaperon, are synthesized and assembled in the rough endoplasmic reticulum (A), and are transported together across Golgi stacks (B); megalin then reaches the apical cell surface and is inserted into microvilli and clathrin-coated pits (C). Megalin, a receptor for many ligands, is internalized with its ligand (1) into early and late endosomes (2), where it dissociates from its ligand, which is taken up by the lysosome (3). The receptor is recycled back (4), via dense apical tubules, to the cell surface, where it becomes competent again to bind ligands

TRANSPORT DES PROTEINES (suite...)

La maladie de DENT

La maladie de Dent est un syndrome de Fanconi d'origine génétique. Elle est caractérisée par une protéinurie (touchant les protéines de faibles poids moléculaires), une aminoacidurie, une hypercalciurie, une hyperphosphaturie et un développement de calculs rénaux. Elle est due à une mutation du gène *CLCN5* codant pour un canal perméable aux ions chlorures *CLC5*.

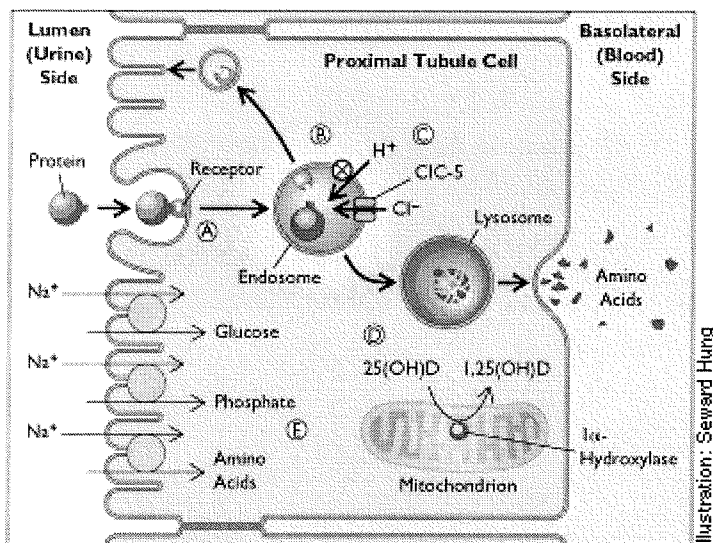


Figure 1. One of the hallmarks of Dent's disease is low-molecular-weight proteinuria. Proteins that are small enough to pass through the glomerular barrier normally adsorb to receptors on the surface of proximal tubule cells and are then transferred by endocytosis to the interior of the cell (A), where they are enzymatically degraded. The first step in the process (B), release from the receptors, requires an acidic environment. This is achieved by continuous proton pumping, which requires an influx of chloride ions to maintain the charge balance (C). In Dent's disease, mutations that inactivate the CLC-5 channel in the endosomal membrane block chloride entry and effectively prevent protein degradation. How this mutation results in hypercalciuria and kidney stones is not yet known. The mechanism may involve abnormal regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D production in the mitochondria (D). However, in many patients, resorption of glucose, phosphate, or amino acids is also abnormal (E).

Le défaut du canal chlorures *CLC5* inhibe l'entrée de chlorures dans les endosomes. Cette inhibition empêche l'acidification du compartiment endosomique nécessaire pour dégrader les protéines de faible poids moléculaires. On observe également dans le tubule proximal un défaut dans le recyclage des protéines membranaires (mégaline par ex.) *CLC5* est également exprimé dans d'autres segments (partie médullaire de l'anse de Henle et cellules intercalaires du canal collecteur) mais l'impact lié à son absence dans la maladie de Dent n'est pas clair.

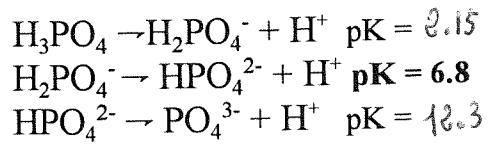
PHYSIOLOGIE DE LA CELLULE PROXIMALE

Transport des phosphates

TRANSPORT DE PHOSPHATES

RAPPEL

Dissociation des phosphates:



$$\text{pH} = 6.8 + \log \frac{[\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]}$$

à pH= 7.4 on aura $[\text{HPO}_4^{2-}] / [\text{H}_2\text{PO}_4^-] = 4/1$

GENERALITES

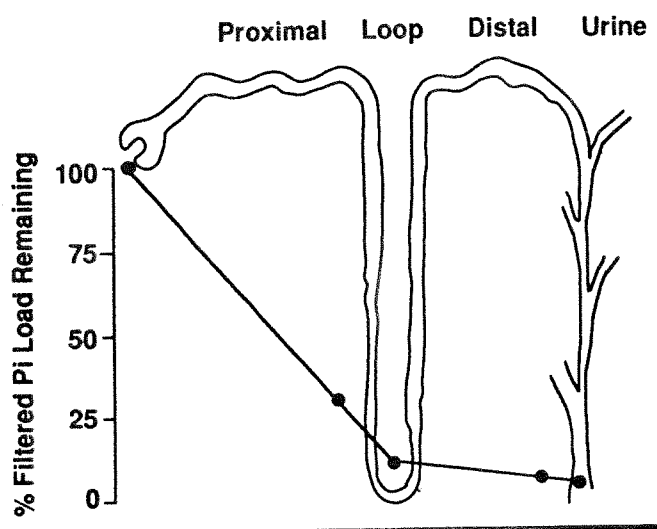
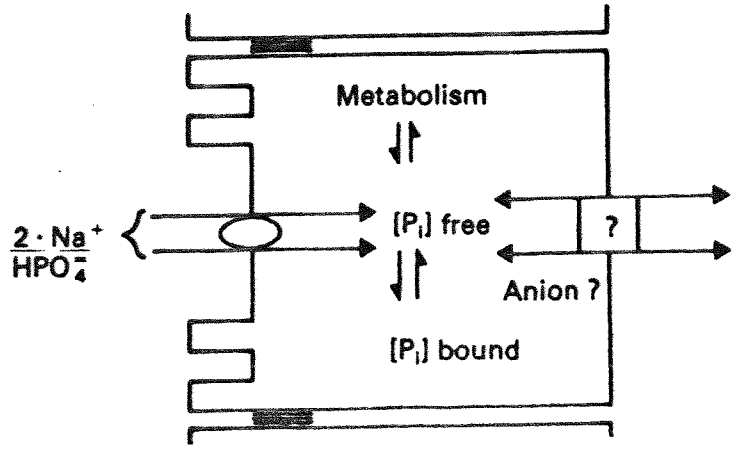


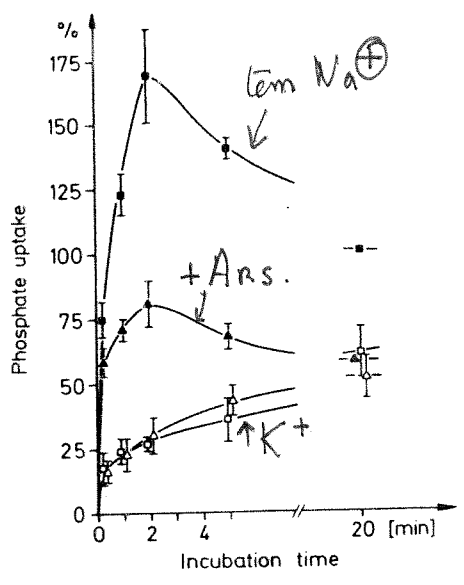
Figure 10-17. Profile of phosphate reabsorption along the mammalian nephron, as derived from micropuncture data.

	Lumen	Cell	Peritubular
V_t	$\pm 2 \text{ mV}$	-65 mV	0 mV
$[P_i]$	2 to 0.2 mM	$< 1 \text{ mM}$	2 mM

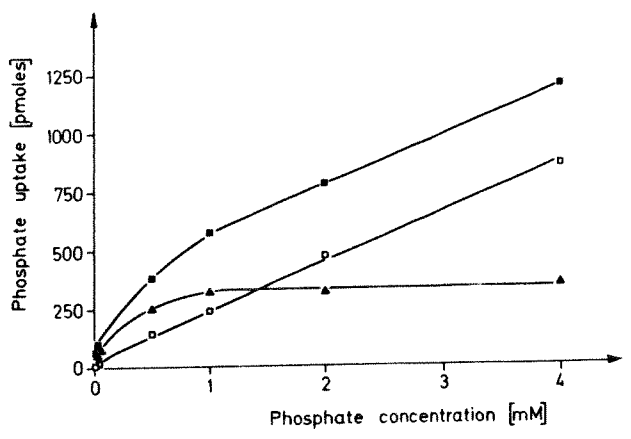


TRANSPORT DE PHOSPHATES

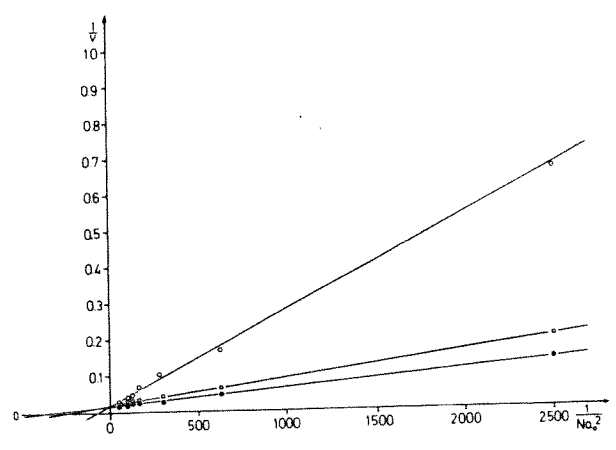
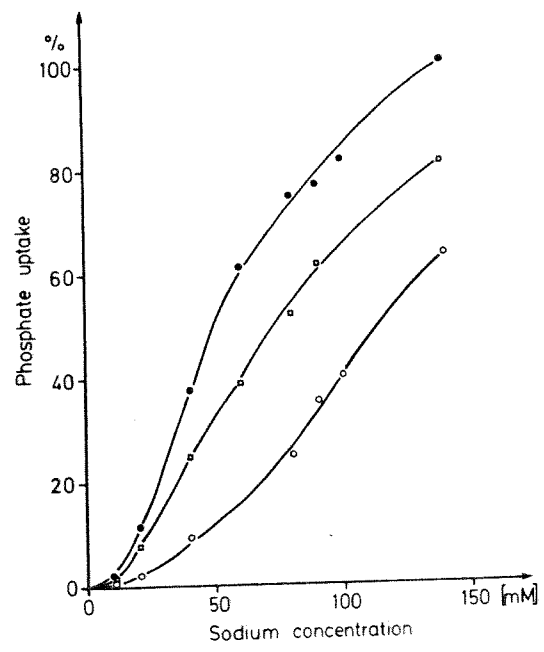
MEMBRANE APICALE



①



②



$$v = \frac{V_m}{1 + \frac{K_{Na}}{C_{Na}}}$$

③

TRANSPORT DE PHOSPHATES

MEMBRANE APICALE

INFLUENCE DES PROTONS

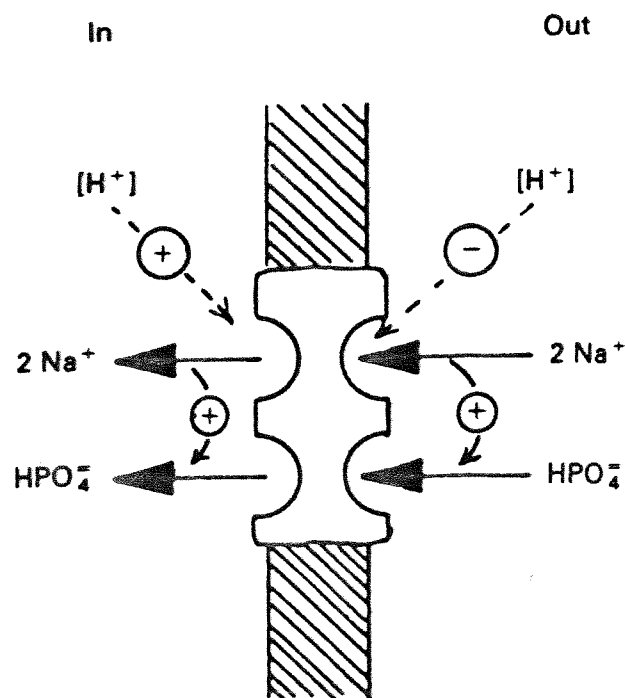
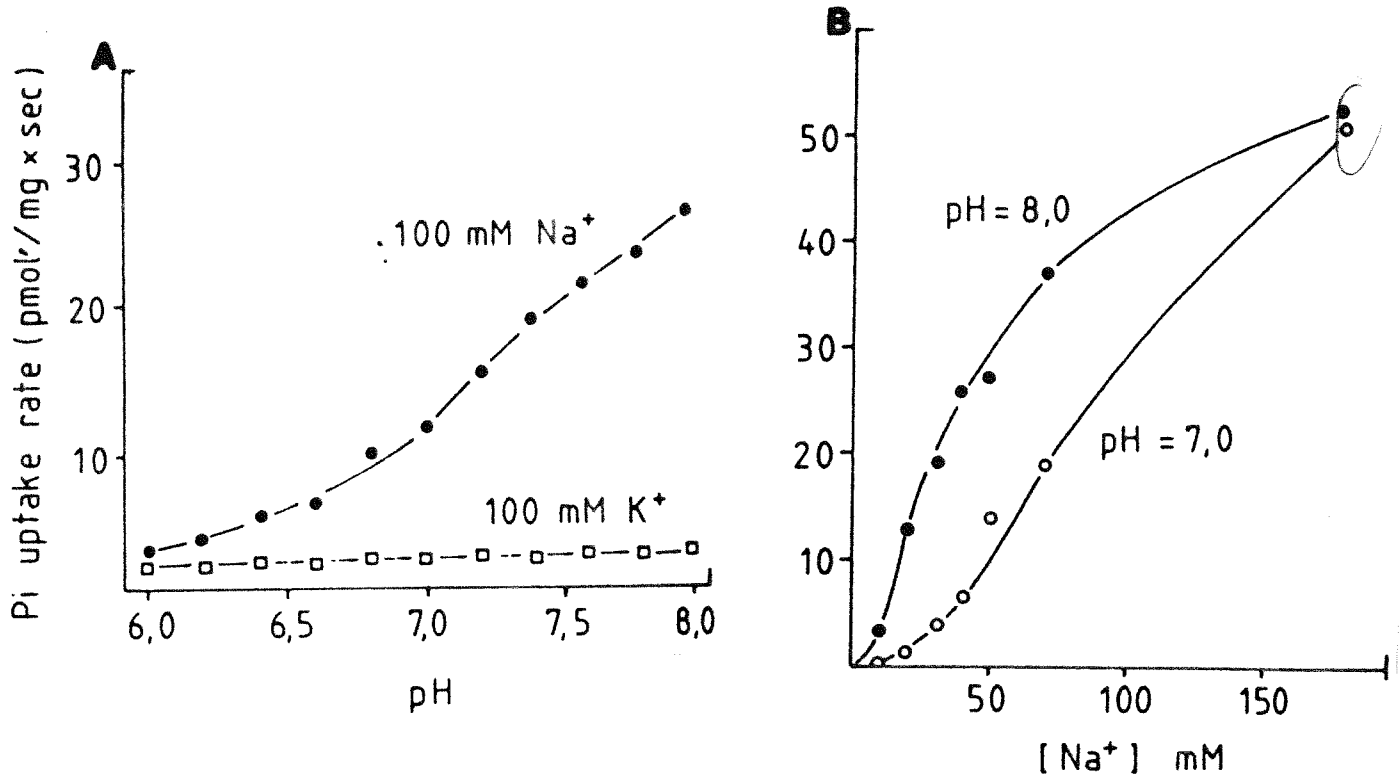


Fig. 2. Model of the interactions of P_i, Na⁺ and H⁺ with the Na⁺/P_i cotransport system of renal brush border membranes. Broken lines point to allosteric inhibition and stimulation by protons.

TRANSPORT DE PHOSPHATES

SCHEMA GENERAL DE LA CELLULE PROXIMALE

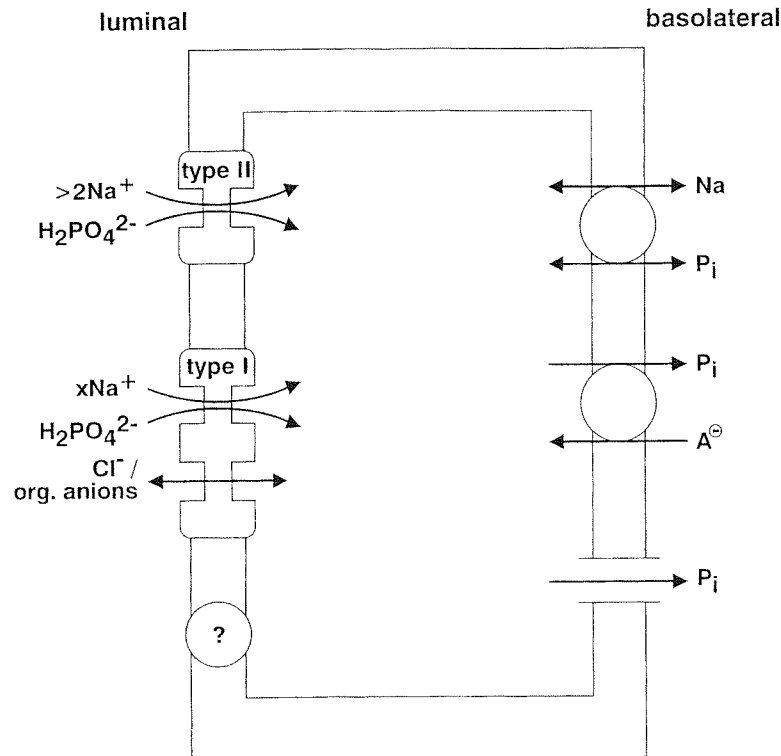


FIGURE 68-1. Scheme of functionally and structurally identified Pi-transporters expressed in the proximal tubular cell. Pi-transport at the luminal site is dependent on sodium and occurs mainly by way of the type II Na/Pi cotransporter. In addition to type I and type II cotransporters, there might exist a third transporter in the luminal membrane, which is indicated by ?. So far, Pi transporters expressed in the basolateral membrane have been identified only functionally. For a detailed description of the single transporters, see the text.

Membrane apicale:

il existe trois systèmes de co-transport:

- le co-transporteur Na/Pi de type I
- le co-transporteur Na/Pi de type II
- le co-transporteur Na/Pi de type III

Membrane basolatérale:

Les transporteurs de phosphates sont mal connus. Il existerait plusieurs systèmes:

- Un transport sodium dépendant.
- Un échangeur anionique
- Un transport électrogénique de type canal

TRANSPORT DE PHOSPHATES

CO-TRANSPORTEUR Na/Pi DE TYPE I

Clonage et structure:

*Identifié à partir d'une banque d'ADN c de cortex rénal de lapin puis par homologie à partir de banques de cortex rénal de rat de souris et d'homme.

*Mal connu, le profil d'hydrophobicité indique une protéine de **6 à 10 domaines transmembranaires**. et 3 sites de N glycosylation.

Expression:

Les ARN m sont exprimés dans le rein et le foie. Par hybridation in situ, les ARN m ont été localisés dans le tubule proximal et un peu dans le distal. La RT PCR à partir d'ARN de tubules microdisséqués indique une **localisation seulement proximale** et l'immunochimie confirme une **localisation apicale**.

Caractérisation fonctionnelle:

Par injection d'ARNc dans les oocytes de Xénope et par transfection d'ADNc dans des cellules MDCK et LLC-PK1, il a été montré l'expression d'un transport de phosphates Na^+ dépendant avec un **Km pour le Na^+ de 45 mM**, un **nombre de Hill de 2** et un **Km pour le PO_4 de 0.3 mM**

Le co-transport serait électroneutre mais pourrait également fonctionner comme un canal Cl^- (anions organiques ?)

Localisation sur le chromosome

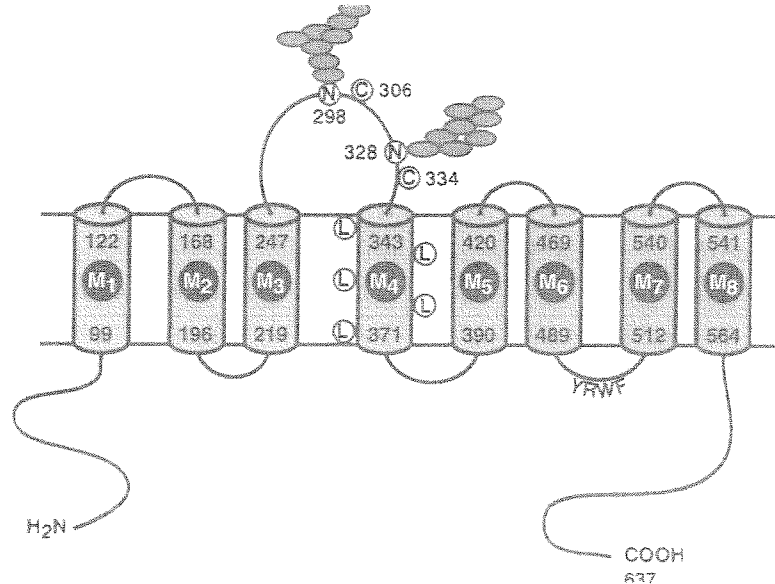
Chez l'homme, le NPT1 (type I) est localisé sur le chromosome 6q21.3-p23

Chez la souris NPT1 appartient au chromosome 13 près du locus Tcrg.

CO-TRANSPORTEUR Na/Pi DE TYPE II

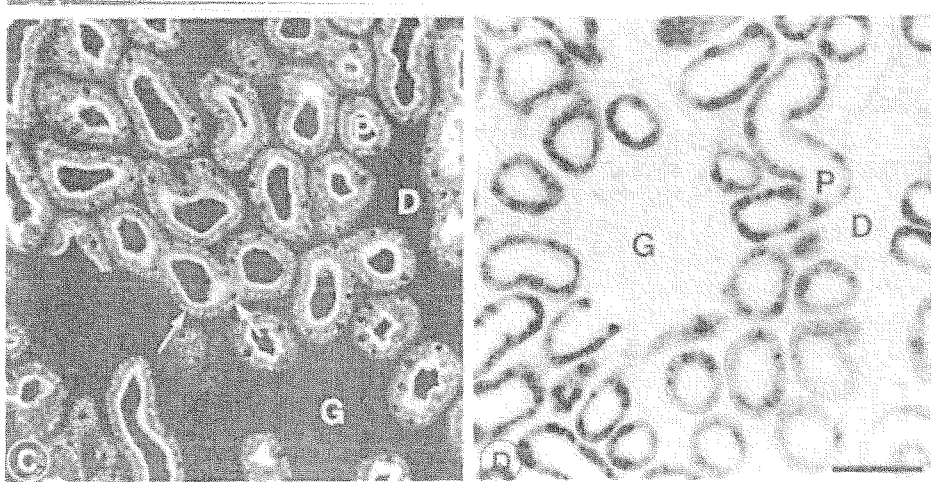
Clonage et structure:

* Deux co-transporteurs Na/Pi ont été clonés par expression dans des oeufs de Xénope en utilisant des banques de rein humain et rein de rat. Ces transporteurs n'ont aucune homologie avec le type I, Ce sont des transporteurs de types II de 635 acides aminés . Des homologues ont été clonés chez le lapin , la souris, l'opossum, le boeuf etc.



Expression:

Dans le rein le type II est localisé uniquement dans les tubules proximaux corticaux (membrane apicale)



IMMUNO

HYBRIDATION

Caractérisation fonctionnelle:

Par injection d'ARNc dans les oocytes de Xénope et par transfection d'ADNc dans des cellules MDCK et LLC-PK1, il a été montré l'expression d'un transport de phosphates Na^+ dépendant avec un Km pour le Na^+ de 40 à 60 mM , un nombre de Hill de 2 et un Km pour le PO_4 de 0.1 à 0.2 mM. Il est activé par les pH alcalins.

Le co-transport est électroneutre

Localisation sur le chromosome

Chez l'homme, le NPT2 (type II) est localisé sur le chromosome 6q35

TRANSPORT DE PHOSPHATES

CO-TRANSPORTEUR Na/Pi de TYPE III

Clonage et structure

Parmi différents types de récepteurs aux retrovirus, le récepteur pour le virus de la leucémie du Gibbon (Glv-1) et le récepteur du virus amphotropique de la souris (Ram-1) présentent une activité de cotransport Na/Pi après expression dans des ovocytes de Xénopes. Ces récepteurs **PiT-1 et PiT-2 représenteraient des co-transporteurs Na/Pi de type III**. Ils n'ont qu'une très faible homologie avec les types I et II.

Expression

Par northern blot, les transcrits de type III ont été détectés dans de nombreux tissus tels le rein, le coeur, le poumon, le muscle le foie et le cerveau.

Dans le rein la RT PCR indique une expression au niveau du cortex et de la médullaire :
rôle de ce transporteur dans la réabsorption rénale de phosphates ?

Caractérisation fonctionnelle:

L'injection d'ARNc codant pour PiT-1 et PiT-2 dans des ovocytes de Xénope, résulte en un cotransport Na/Pi avec un Km pour les PO₄ de 20 à 30 μM et un Km pour le Na⁺ de 40 à 50 mM. Des mesures électrophysiologiques indiquent une électrogénéité du système qui **transporterait un excès d'ions Na⁺**

TRANSPORTEURS IMPLIQUES AU NIVEAU RENAL

Les types I et II sont localisés au niveau de la membrane apicale. Il n'y a aucune évidence de localisation apicale du type III.

L'utilisation d'ARN antisens indiquent que la majeure partie de la réabsorption proximale se ferait par le type II.

Des expériences utilisant des souris knock-out pour le type II confirment l'implication majoritaire du type II mais suggèrent aussi l'intervention d'un autre transporteur.

REGULATION DU TRANSPORT DE PHOSPHATES

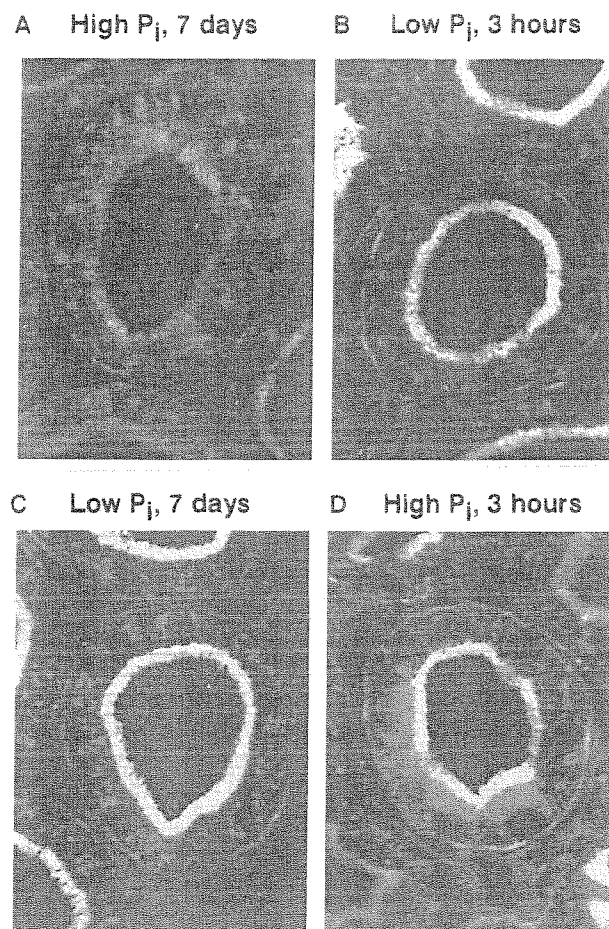
ADAPTATION AU REGIME ALIMENTAIRE

Le contenu en phosphates du régime alimentaire influence considérablement le transport. Par microponctions, microinjections ou en utilisant des vésicules de bordure en brosse, il a été démontré que **l'activité du co-transport Na/Pi est augmentée en cas d'un régime à faible teneur en PO_4 et diminuée dans le cas d'un régime riche en PO_4 .**

L'adaptation est rapide (2 à 4 heures, adaptation aiguë) et se prolonge plusieurs jours (adaptation chronique).

Des expériences de western blot et immuno-histochimie montrent que c'est **le type II qui est concerné. C'est le V_{max} du transport qui est modifié** (nombre de transporteurs).

Le mécanisme de cette adaptation reste inconnu.

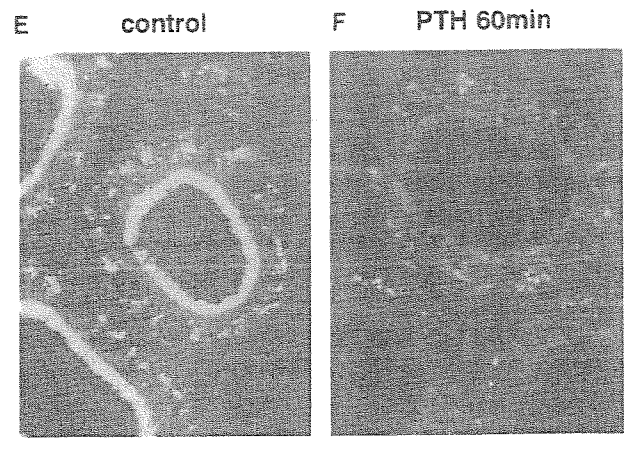
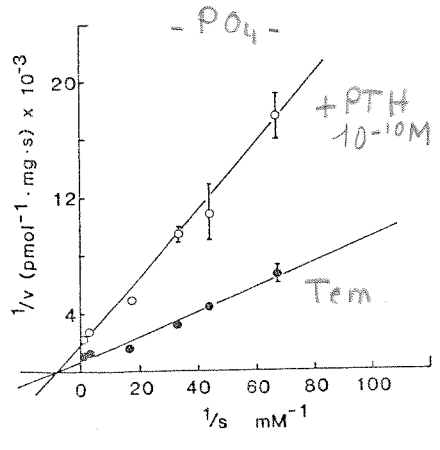
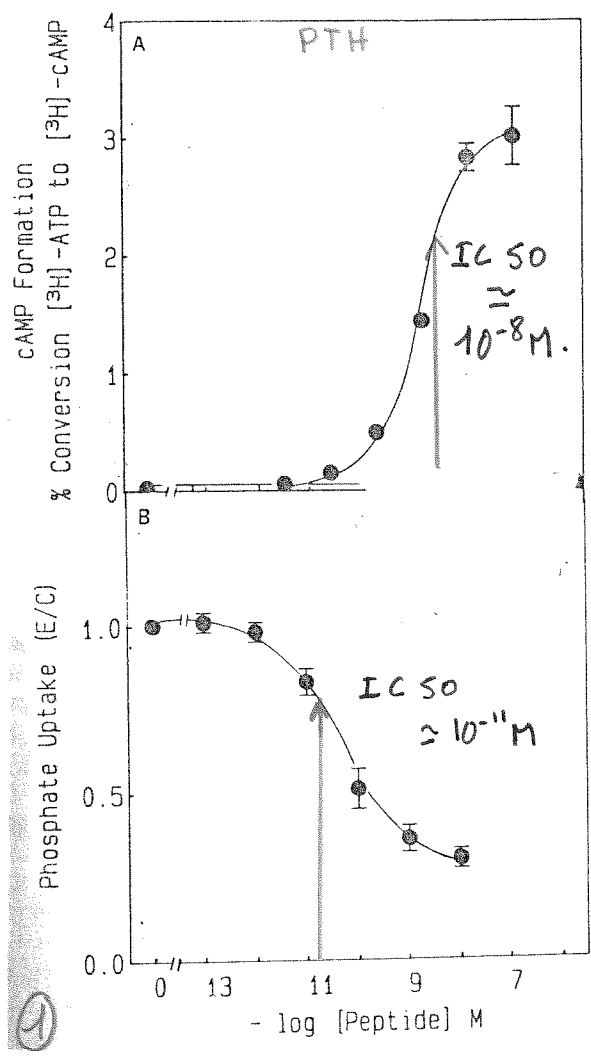
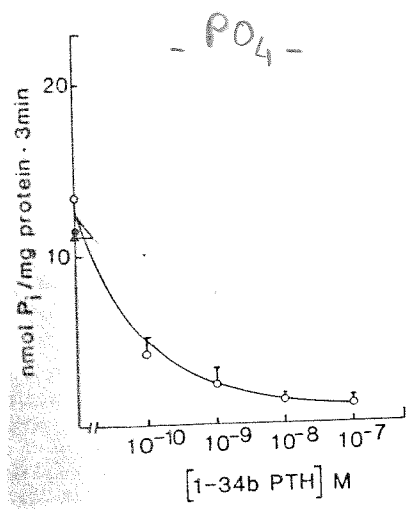


REGULATION DU TRANSPORT DE PHOSPHATES

ROLE DE LA PARATHORMONE

La parathormone induit une **phosphaturie** en inhibant la réabsorption proximale de PO_4 .

L'AMPC est impliquée. L'action se ferait sur le **Vmax du type II**

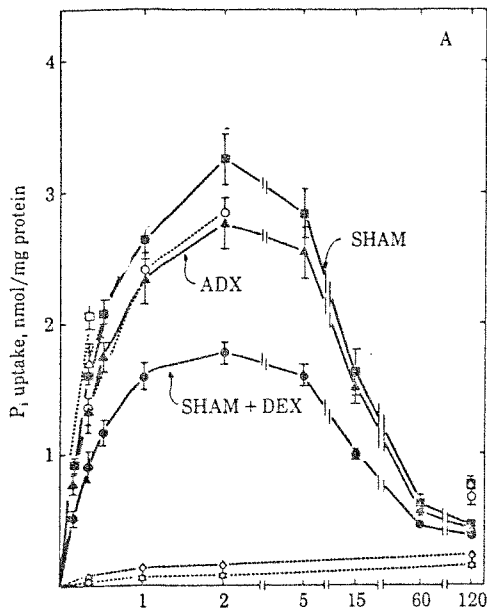


REGULATION DU TRANSPORT DE PHOSPHATES

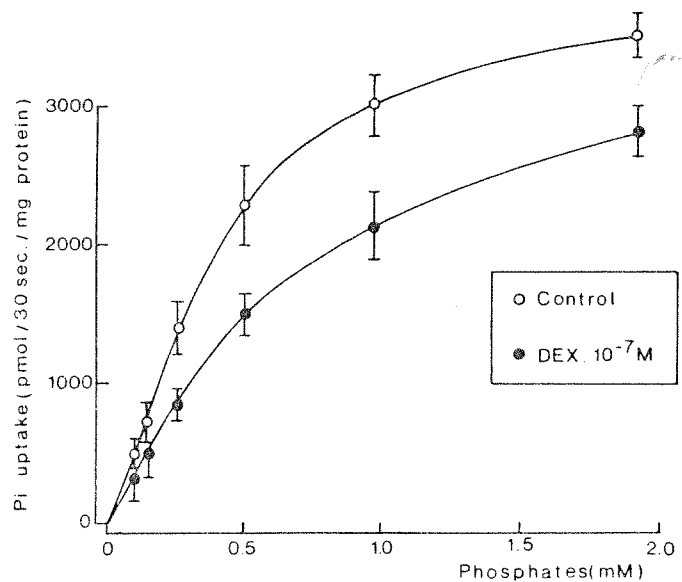
ROLE DES GLUCOCORTICOIDES

Les glucocorticoïdes sont phosphaturiques après une administration aiguë ou chronique. Il diminueraient l'activité du type II.

BBMV



4 ISOLÉES



AUTRES FACTEURS

Dopamine et sérotonine

La dopamine est phosphaturique et la sérotonine anti-phosphaturique.

La dopamine est synthétisée par les cellules proximales à partir de l-dopa et agirait par voie paracrine par des récepteurs DA1 et DA2

Facteurs de croissance:

L'hormone de croissance augmente le transport proximal de PO_4 par IGF1

L'insuline diminue l'excrétion de PO_4 et bloque l'effet de la PTH.

Vitamine D

Etat acido-basique

Calcium plasmatique

Métaux lourds

HYPER ET HYPO-PHOSPHATEMIES ACQUISES

HYPO-PHOSPHATEMIES

inclure la table 69-3

TABLE 69-3. CAUSES OF ACQUIRED HYPOPHOSPHATEMIA RELATED TO URINARY LOSSES

Impaired tubular function
Exaggerated parathyroid hormone secretion
Production of PTHrP
Mesenchymal tumoral factor «phosphatonin»
Insulin-dependent diabetes mellitus
Diuretics
Renal transplantation
Glucocorticoid therapy

HYPER-PHOSPHATEMIES

TABLE 69-4. CAUSES OF ACQUIRED HYPERPHOSPHATEMIA OF RENAL ORIGIN

Cause	Mechanism
Renal failure	In chronic renal failure, plasma phosphate concentration increases when GFR <20 mL/min (in early stage of chronic renal failure, secondary hyperparathyroidism decreases phosphate reabsorption). Acute renal failure may be associated with, but not causative of, hyperphosphatemia (hemolysis, rhabdomyolysis)
Hypoparathyroidism	Acquired after destruction of parathyroid glands (surgery, radiotherapy, hemochromatosis, cancer metastases) or idiopathic
Increased growth hormone secretion (acromegaly)	Increased proximal phosphate reabsorption
Tumoral calcinosis	Calcium and phosphate tumor-like depositions (hips, elbows, shoulders) ↑ intestinal calcium and phosphate absorption (due to ↑ vitamin D) and ↑ renal absorption (despite normal PTH)

GFR, glomerular filtration rate; PTH, parathyroid hormone.

HYPO-PHOSPHATEMIES FAMILIALES

HYPO-PHOSPHATEMIE DOMINANTE LIEE AU CHROMOSOME X (X-linked dominant hypophosphatemic rickets, XLHR)

C'est la forme la plus commune des hypo-phosphatémies avec un rachitisme osseux (1/20000 naissances viables). Les symptômes sont une **hypo-phosphatémie avec un défaut en 1,25 dihydroxyvitamine D3 circulante**. Des modèles homologues de la maladie humaine existent chez la souris: ce sont les mutations *Hyp et Gy* induisant une inhibition de la réabsorption rénale de PO_4 qui s'explique par une **diminution du transporteur de type II**. Cependant les gènes du type II (npt2) et du type I (npt1) sont sur les chromosomes 5 et 6 et ne peuvent donc pas être les gènes responsables de la maladie.

Le gène impliqué se réfère à **PEX** (gène régulateur du phosphate ayant des homologies avec l'endopeptidase sur le chromosome X). Il est localisé sur **Xp22.1**. En fait ce gène modulerait un facteur extra-rénal circulant qui inter-agirait avec le transporteur de type II.

HYPO-PHOSPHATEMIE AUTOSOMALE DOMINANTE (Autosomal dominant hypophosphatemic rickets, ADHR)

ADHR est également caractérisée par une perte rénale de phosphates et un défaut en calcitriol circulante. Elle est liée à **12p13** et n'est pas associée à un défaut du gène PEX. XLHR et ADHR sont des entités cliniques différentes.

MALADIE OSSEUSE HYPOPHOSPHATEMIQUE (hypophosphatemic bone disease, HBD)

HBD est une forme atténuée de ADHR.

HYPO-PHOSPHATEMIE RECESSIVE LIEE AU CHROMOSOME X (X-linked recessive hypophosphatemic rickets)

Dans cette forme, l'hypophosphatémie est accompagnée de néphrolithiases hypercalciuriques.

Des mutation du gène **CICN5**, qui code pour un canal chlorures rénal situé sur **Xp11.22**, seraient associées à XLHR mais aussi à des néphrolithiases hypercalciuriques liées au chromosome X. Le rôle de ce canal est inexpliqué

AUTRES HYPOPHOSPHATEMIES

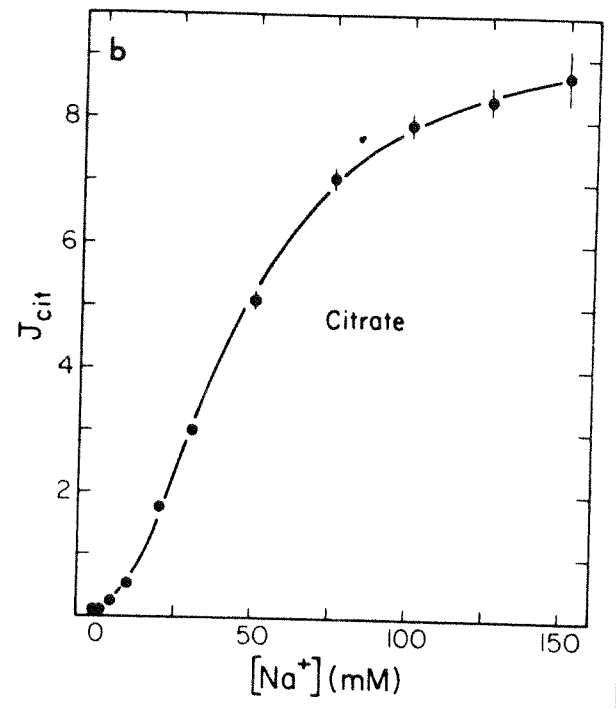
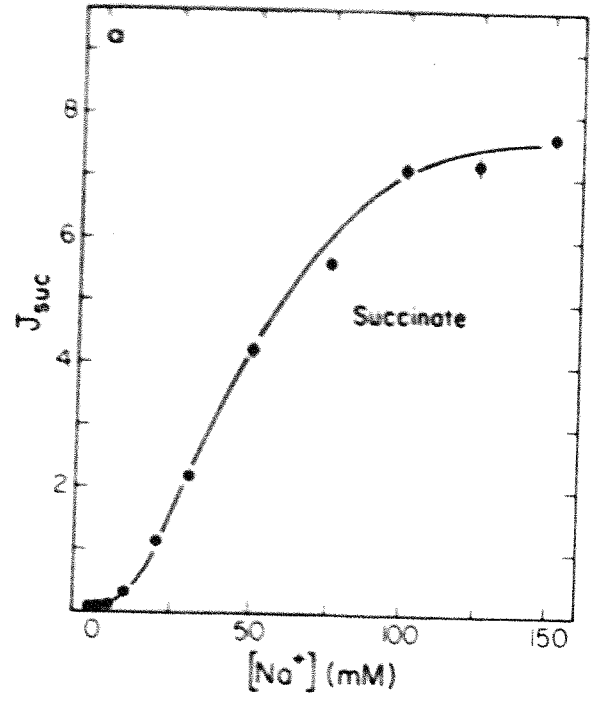
Elles ne sont plus liées à un défaut du système de transport mais sont la conséquence d'un défaut métabolique ou d'un mauvais fonctionnement de la PTH ou de la vitamine D

PHYSIOLOGIE DE LA CELLULE PROXIMALE

Transport des anions organiques

TRANSPORT DES ANIONS ORGANIQUES

ACIDES ORGANIQUES DU CYCLE DE KREBS



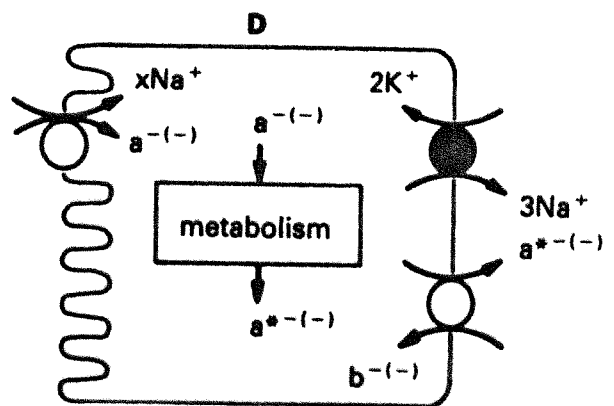
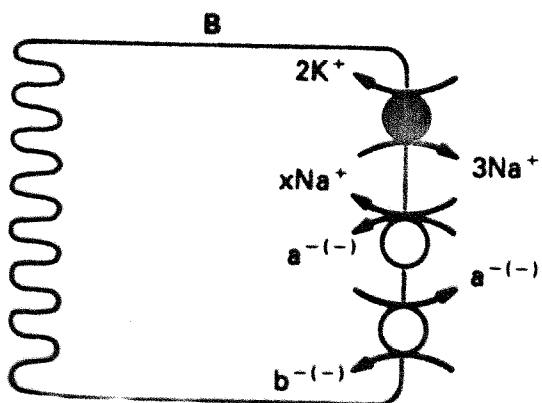
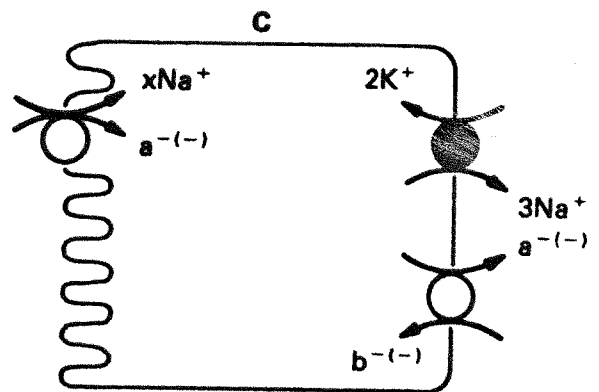
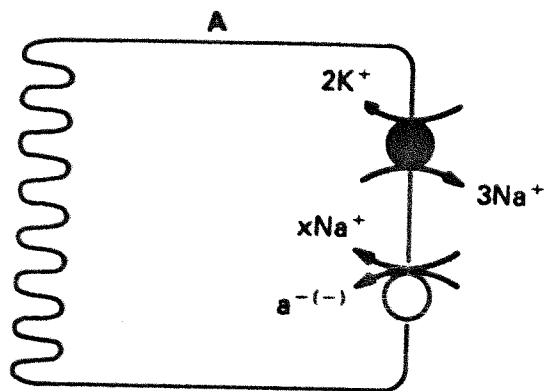
$$J = \frac{J_{max}}{[1 + (K_s / Na)]^3}$$

$3 Na^+$ par molécule \Rightarrow

à $pH = 7.4$ c'est la forme di-anionique du citrate qui est transportée.

TRANSPORT DES ANIONS ORGANIQUES

DIFFERENTS SYSTEMES DE TRANSPORT



TRANSPORT DES ANIONS ORGANIQUES

CAS PARTICULIER DU PAH

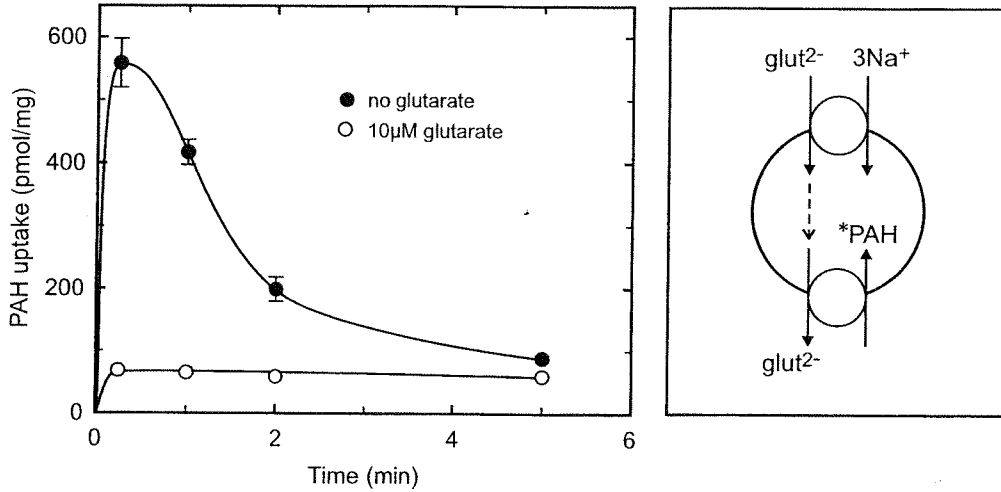


FIGURE 7-1. Stimulation of *p*-aminohippurate (PAH) uptake in rat renal basolateral membrane vesicles by glutarate in the presence of an inward Na⁺ gradient. **Left panel:** Vesicles preloaded with 150 mM KCl, 20 mM HEPES/Tris, pH 7.4, were suspended at zero time in buffers containing 150 mM NaCl, 20 mM HEPES/Tris, pH 7.4, labeled PAH and no (○) or 10 μM (●) glutarate. Shown are means ± SEM from 5 determinations. **Right panel:** The scheme indicates the cooperation of Na⁺-dicarboxylate symporter and PAH/dicarboxylate antiporter during glutarate- and Na⁺-stimulated PAH uptake. (Modified from Burckhardt G, Ullrich KJ. Organic anion transport across the contraluminal membrane—dependence on sodium. *Kidney Int* 1989;36:370–377.)

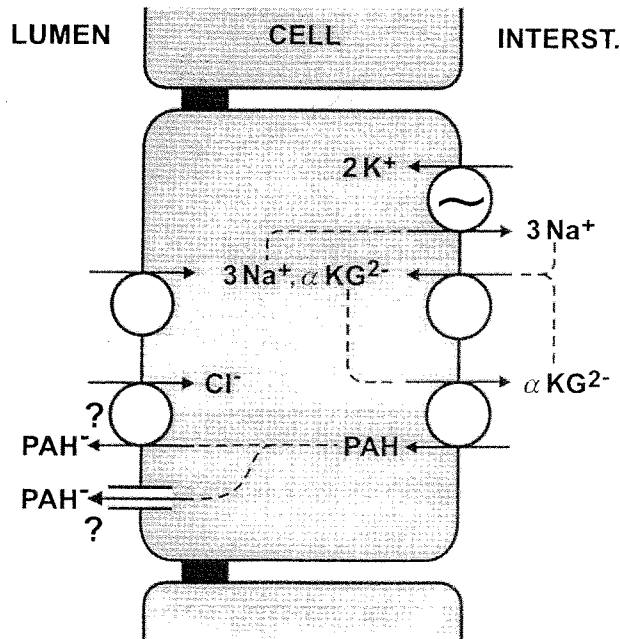


FIGURE 7-2. Schematic representation of transporters involved in transepithelial *p*-aminohippurate secretion. The left-hand side of the proximal tubule cell faces the tubule lumen; the right-hand side faces the interstitial fluid (blood side). Transporters are symbolized by circles; the preferred transport direction is shown by the arrows.

TRANSPORT DES ANIONS ORGANIQUES

CAS DES URATES

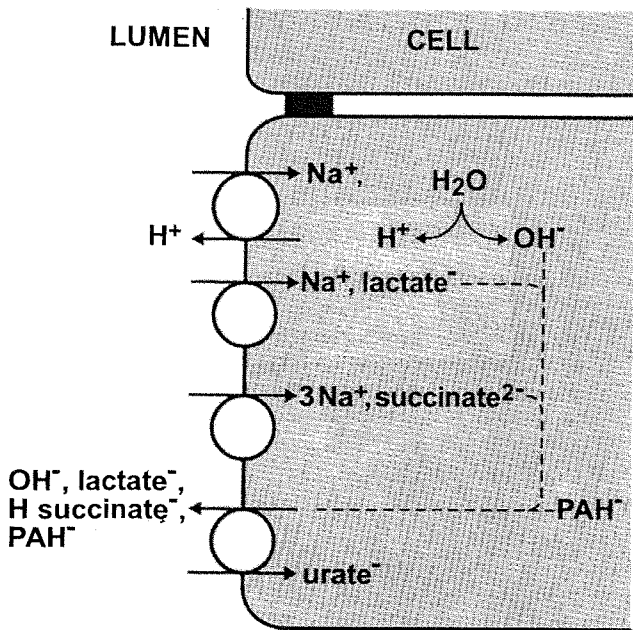


FIGURE 7-6. Urate uptake mechanisms in the brush-border membrane of a urate absorber (dog). Urate uptake can occur in exchange against intracellular OH⁻, lactate, monovalent succinate (H succinate) or PAH (PAH⁻). Lactate and succinate are accumulated within the cell by way of Na⁺-coupled transporters located also in the brush-border membrane. The OH⁻ ions are left from Na⁺-driven H⁺-extrusion through the Na⁺/H⁺ antiporter. Intracellular PAH stems from basolateral PAH/ α -ketoglutarate antiport, which, in turn, is energized by (3 Na⁺)-dicarboxylate symport (not shown) (c.f., Fig. 7-2). Hence, urate uptake is tertiary active, that is, it depends indirectly on Na⁺ gradients which are maintained by operation of the Na⁺,K⁺-ATPase in the basolateral membrane (not shown in the figure). (Data from Refs. 17, 76, 100, 103, and 245.)

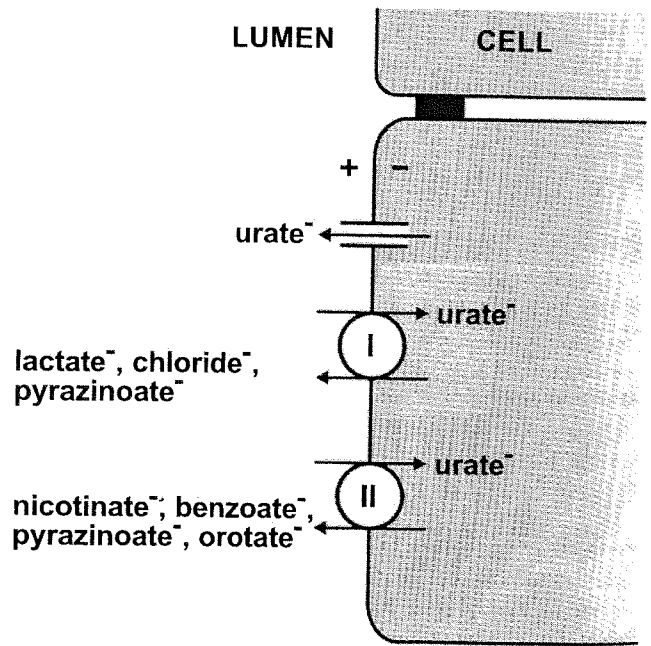
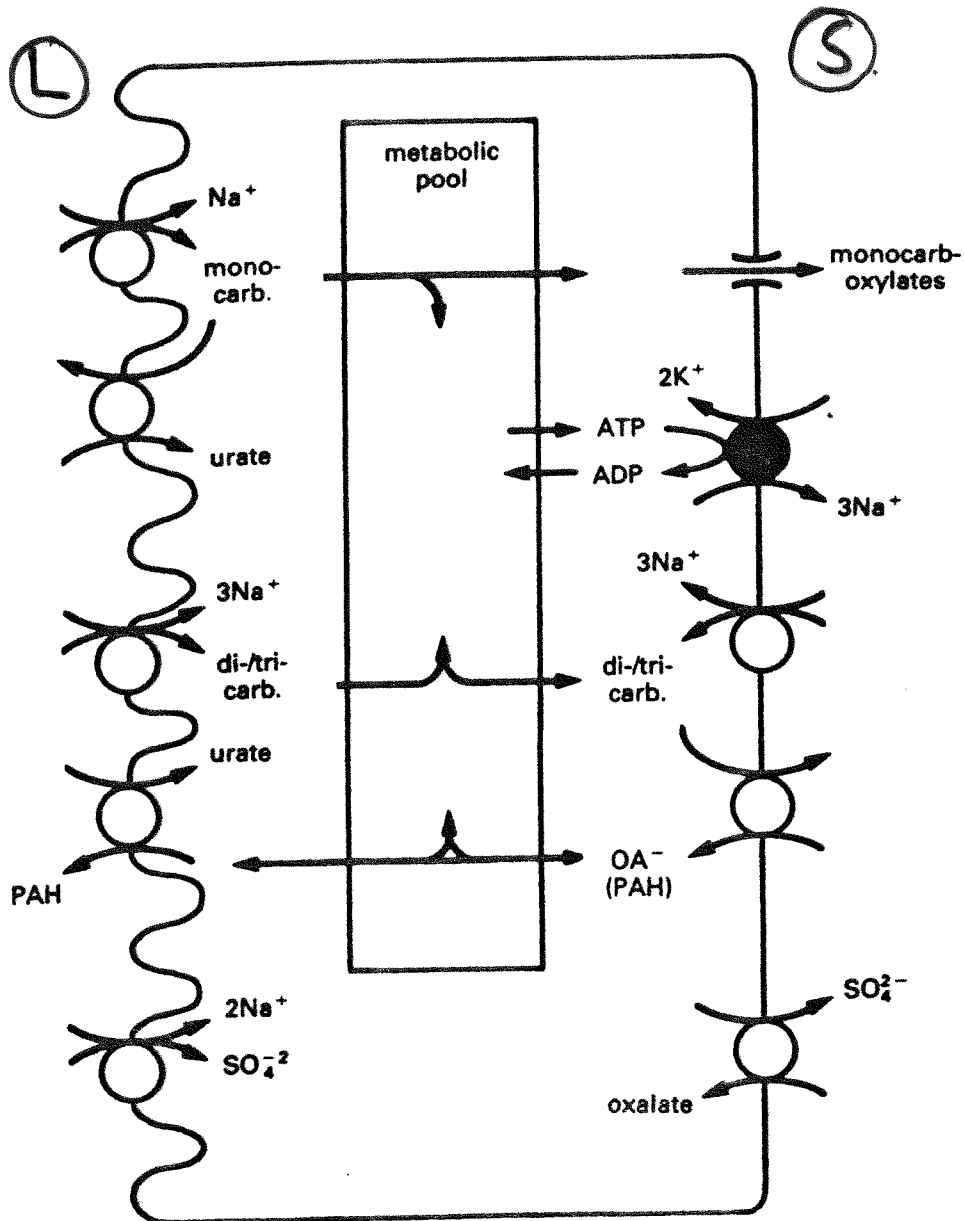


FIGURE 7-7. Urate transport across the brush-border membrane of human proximal tubule cells. In human renal brush-border membrane vesicles, three urate transporters exist, a voltage-sensitive urate transporter, which facilitates urate secretion, and two urate/anion antiporters serving in urate reabsorption. Antiporter I can exchange luminal urate primarily against intracellular chloride or aliphatic organic anions (e.g., lactate); whereas, antiporter II preferably exchanges urate against cyclic organic anions (e.g., nicotinate, benzoate). The antiuricosuric pyrazinoate is accepted by both antiporters. (Data from Refs. 198, 199, 200, and 202.)

TRANSPORT DES ANIONS ORGANIQUES

SCHEMA GENERAL



Schematic representation of the interactions between various transport systems for organic anions in the luminal and contraluminal membrane.

· PHYSIOLOGIE DE LA CELLULE PROXIMALE

Régulation du pH

REGULATION DU pH

METHODES DE MESURE

Microélectrodes intracellulaires

*Fonctionnent comme les électrodes à pH classiques

Distribution des acides et des bases faibles.

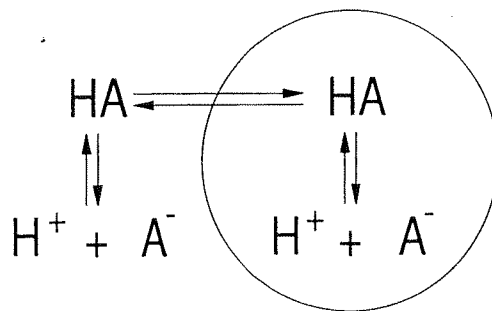


FIGURE 17-1. The distribution of a monoprotic weak acid across a cell membrane. When placed in the external solution, HA passively enters the cell, where it dissociates to form H^+ and A^- . Once $[HA]_i = [HA]_o$, the equilibrium $HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$ holds in both the intracellular and extracellular fluids.

Si la cellule est exposée à un acide faible HA, la molécule neutre rentre rapidement dans la cellule. Si l'on assume que la forme A^- est faiblement perméable, l'entrée de HA se poursuivra jusqu'à l'équilibre de part et d'autre de la membrane. A l'intérieur de la cellule, HA se dissocie et le pH intracellulaire s'abaisse. On aura la constante de dissociation K :

$$K = [H^+] \times [A^-] / [HA]$$

Si l'on admet que cette constante est identique dans les deux compartiments, on aura à l'équilibre

$$[H^+]_i / [H^+]_o = [A^-]_o / [A^-]_i$$

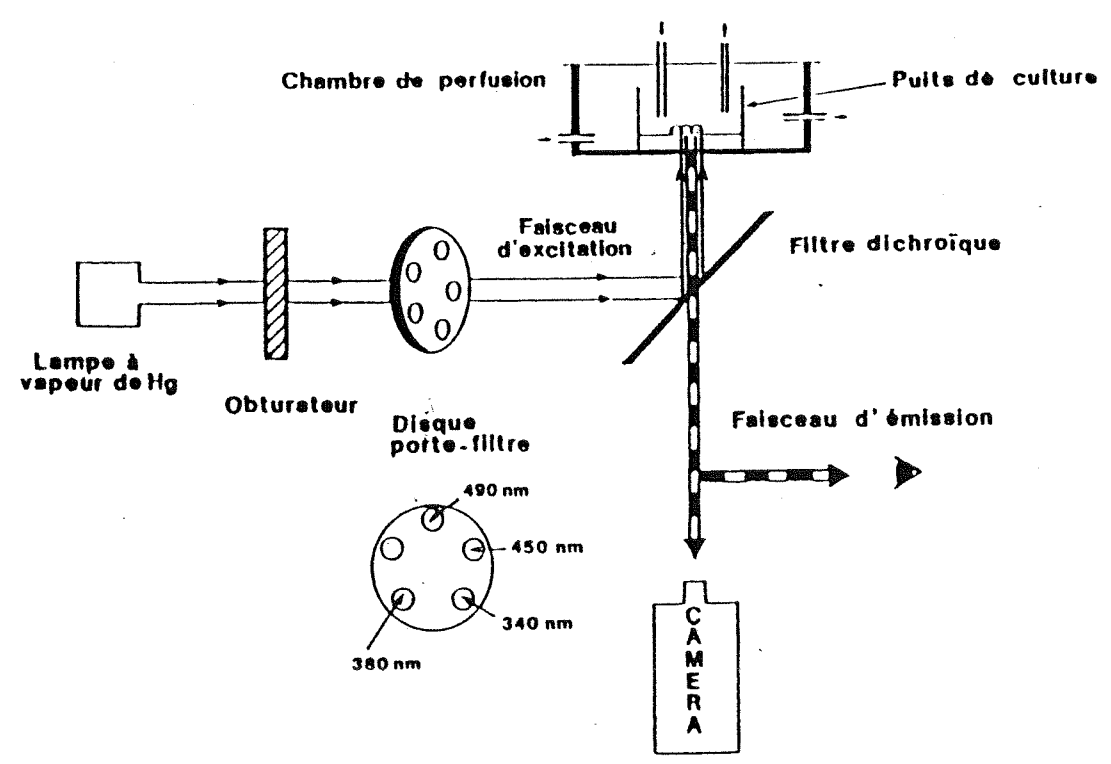
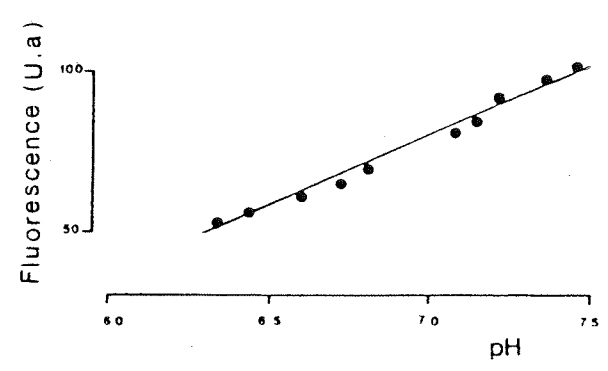
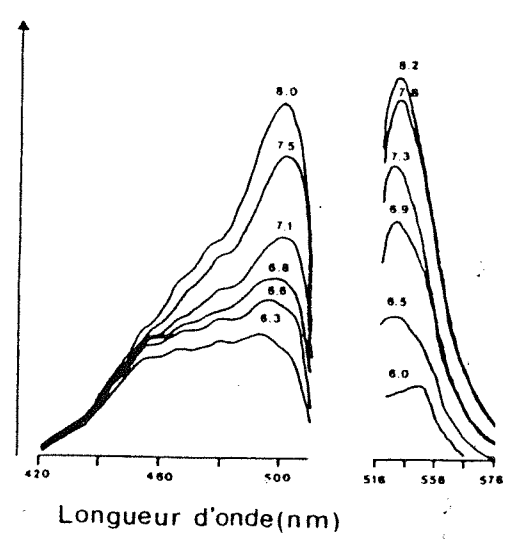
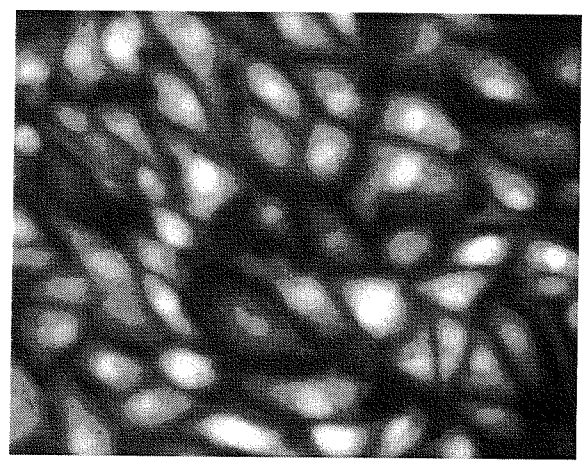
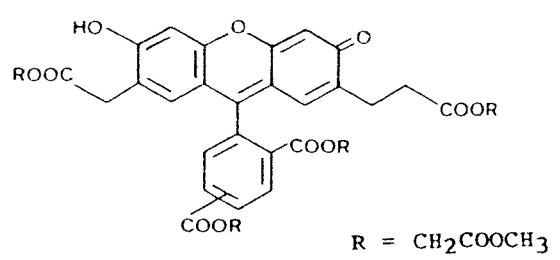
On utilise le plus souvent le DMO (dimethyl-oxazolidinedione) ou l'acide benzoïque marqué au ^{14}C . On peut également utiliser l'orangé d'acridine et mesurer la fluorescence.

REGULATION DU pH

METHODES DE MESURE

Colorants sensibles au pH:

Le BCECF



REGULATION DU pH

MECANISMES DE TRANSPORT

Pour réguler le pH il est nécessaire d'avoir des transporteurs d'acides et de bases. Il faut des systèmes qui soient capables d'acidifier la cellule et à l'inverse des systèmes capables de l'alcaliniser.

SYSTEMES DE TRANSPORTS ACIDIFIANTS:

Echangeurs $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ et/ou Cl^-/OH^-

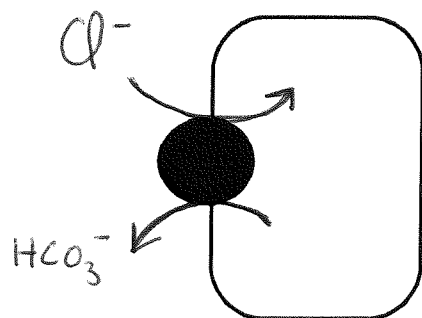
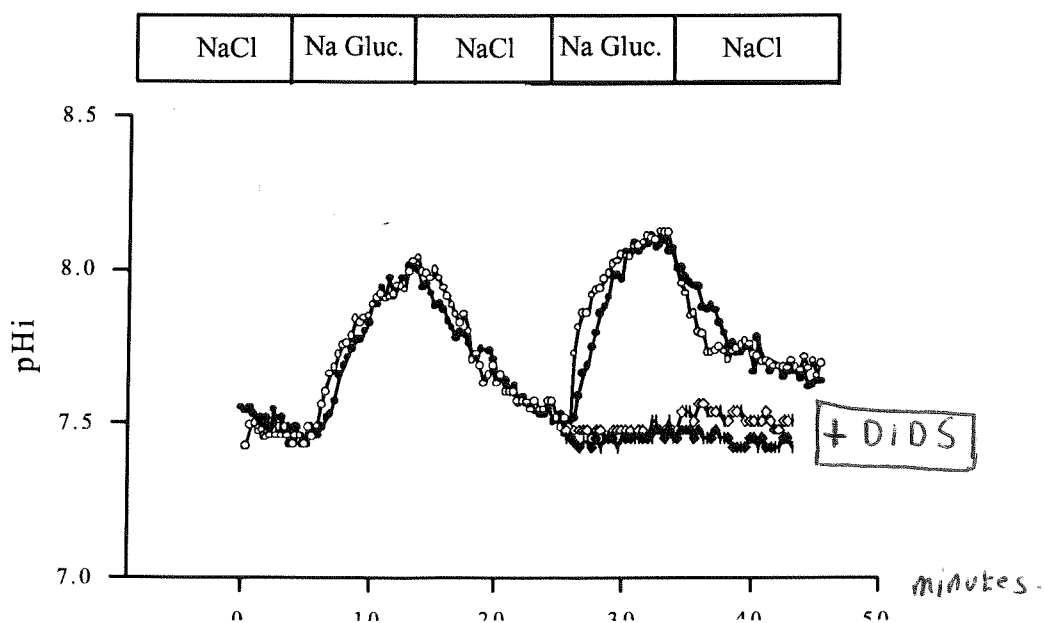
Ces échangeurs couplent l'influx de Cl^- à la sortie de HCO_3^- . Ils ont été clonés dans le globule rouge et représentent les protéines de la bande 3 (position sur le gel SDS). Ce sont des échangeurs d'anions (AE). 3 gènes ont été clonés: AE1, AE2, AE3. La famille des gènes AE est une branche de la super famille des transporteurs de bicarbonates.

AE1 est majoritairement exprimé dans le globule rouge

AE2 est épithélial et bien représenté dans le rein

AE3 est plus abondant dans le cerveau, le coeur et l'épithélium intestinal.

Mise en évidence dans des cellules rénales



REGULATION DU pH

MECANISMES DE TRANSPORT

SYSTEMES DE TRANSPORTS ACIDIFIANTS (suite)

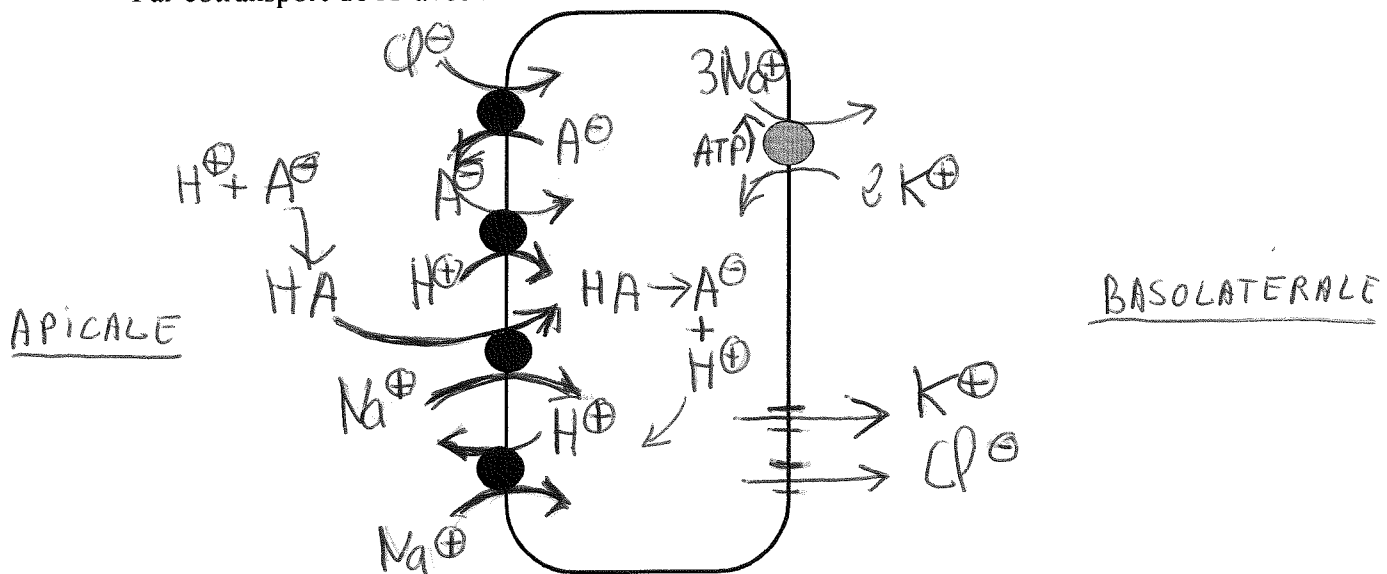
Echangeurs Cl⁻/anions organiques

Ces échangeurs couplent l'influx de Cl⁻ à la sortie d'un anion organique (formate, oxalate, butyrate). Ils sont distincts des AE mais leur nature moléculaire n'est pas élucidée.

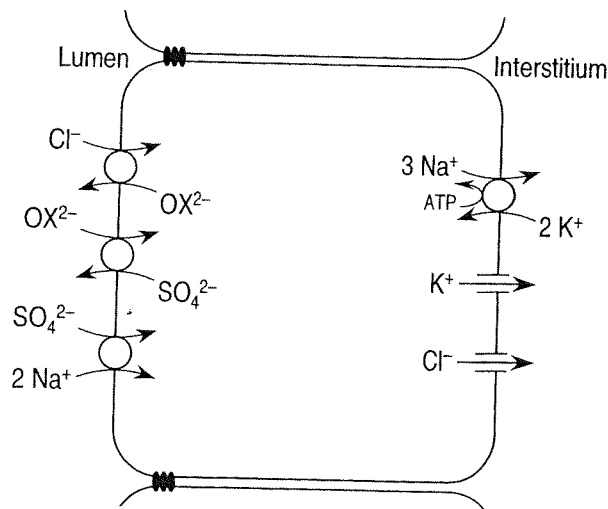
.Le co-transport est électroneutre. L'acidification intracellulaire se fait :

*Par diffusion non ionique ou par transport facilité de la forme HA qui est ensuite déprotonée à l'intérieur de la cellule.

* Par cotransport de A⁻ avec H⁺



Ces transporteurs peuvent aussi être impliqués dans la réabsorption de Na⁺



REGULATION DU pH

MECANISMES DE TRANSPORT

SYSTEMES DE TRANSPORTS ACIDIFIANTS (suite)

Co-transporteurs $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ électrogéniques

Dans la membrane apicale du tubule proximal, le co-transporteur $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC) est électrogénique et favorise un efflux net de 1 Na^+ pour 3 HCO_3^- . Il induit donc une acidification de la cellule. Avec les AE le NBC fait partie de la superfamille des transporteurs de bicarbonates.

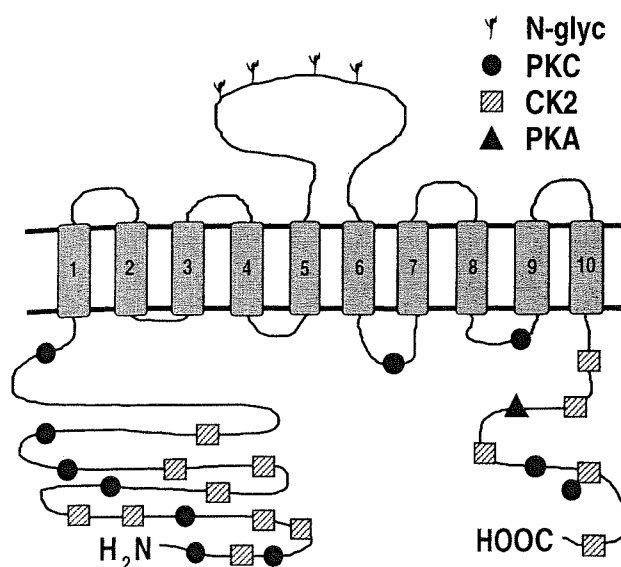


FIGURE 17-12. Predicted membrane topology of *Ambystoma*-kidney NBC (akNBC). According to the model, there are 10 transmembrane (TM) domains, and many consensus sites for protein kinase C (PKC) and casein kinase II (CK2). Also, there are four consensus sites for N-linked glycosylation on the exofacial loop between TM 5 and TM 6.

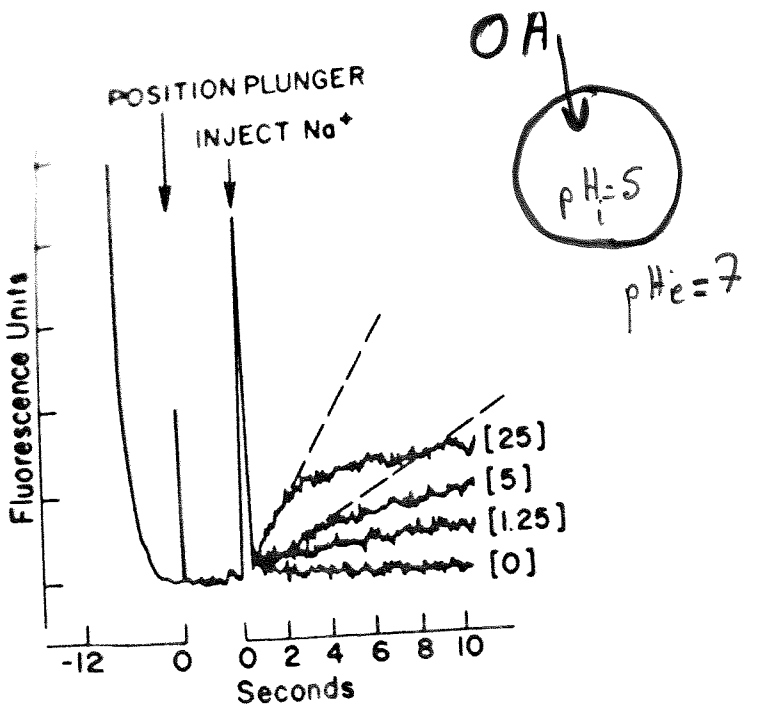
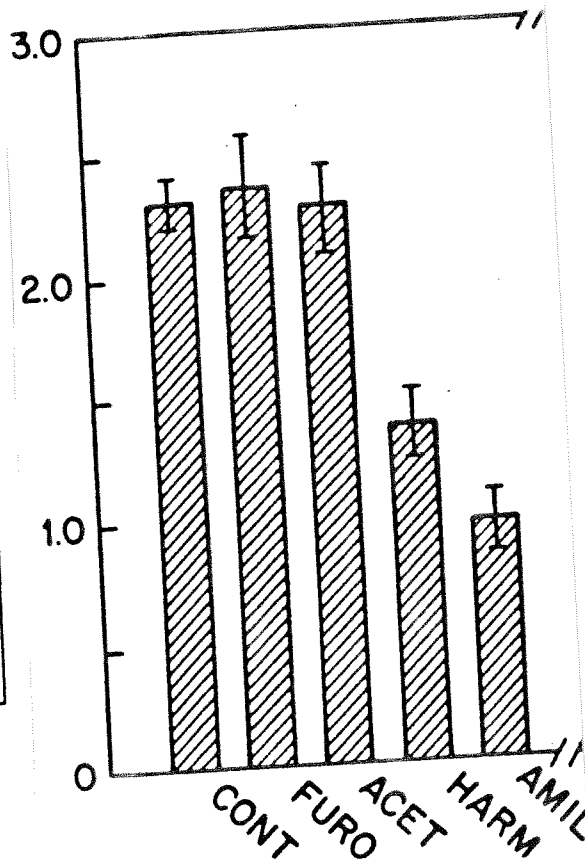
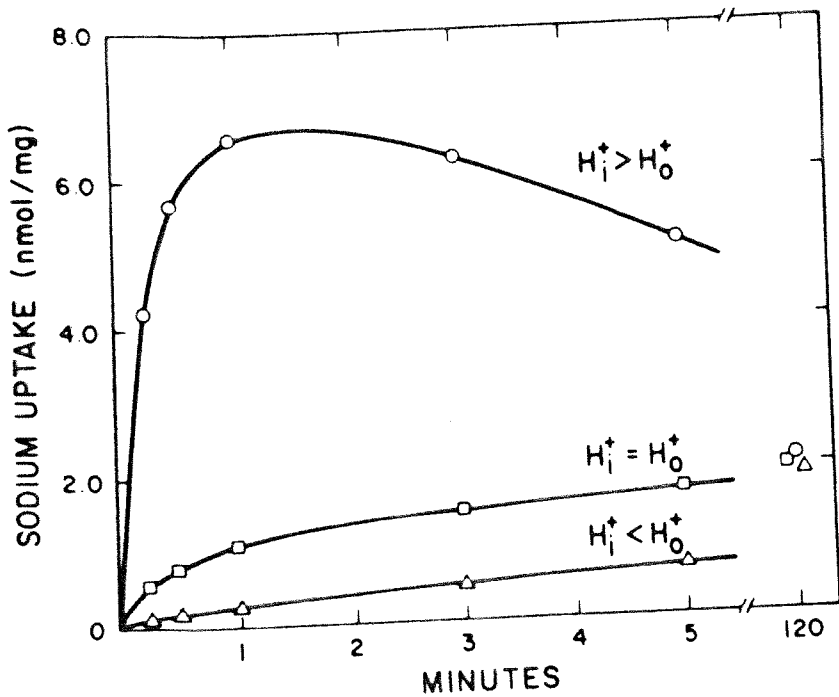
REGULATION DU pH

MECANISMES DE TRANSPORT

SYSTEMES DE TRANSPORTS ALCALINISANTS

L'échangeur sodium / proton

*Mise en évidence et propriétés générales:
Sur des vésicules de bordures en brosse



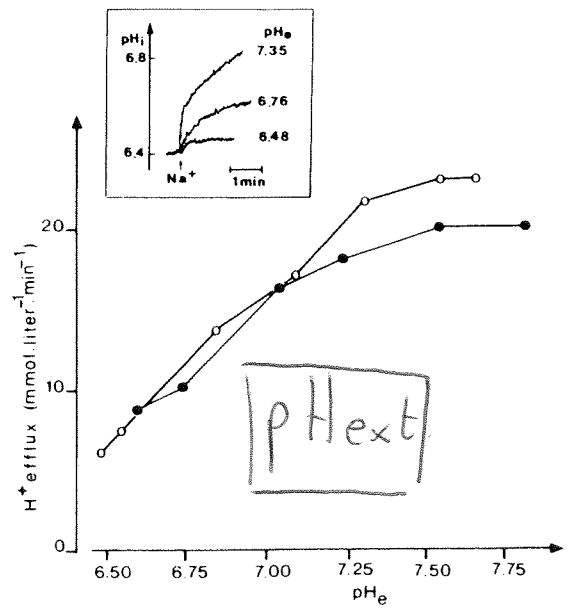
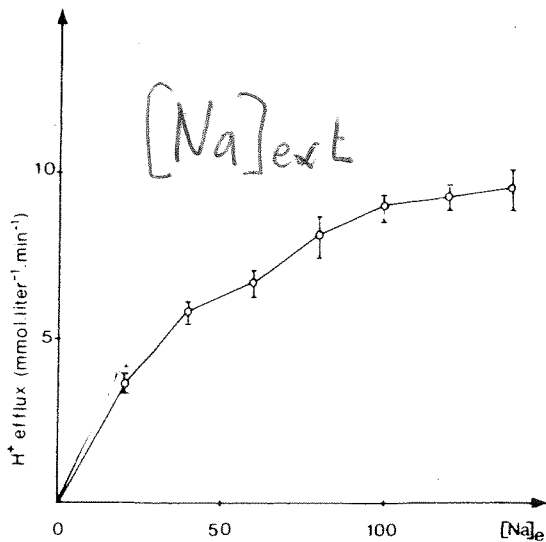
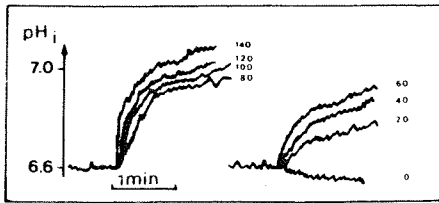
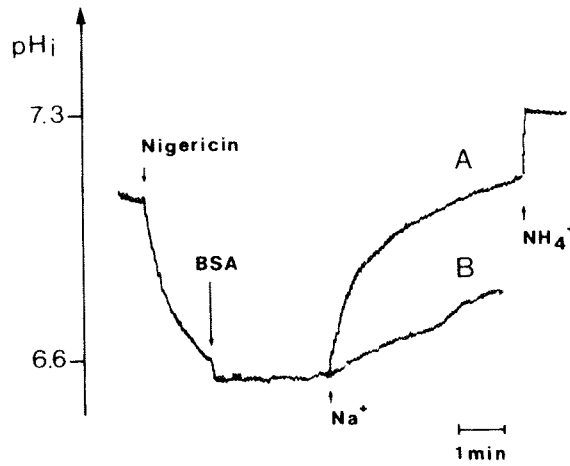
REGULATION DU pH

MECANISMES DE TRANSPORT

SYSTEMES DE TRANSPORTS ALCALINISANTS

L'échangeur sodium / proton

***Mise en évidence et propriétés générales:**
Sur des cellules de tubule proximal



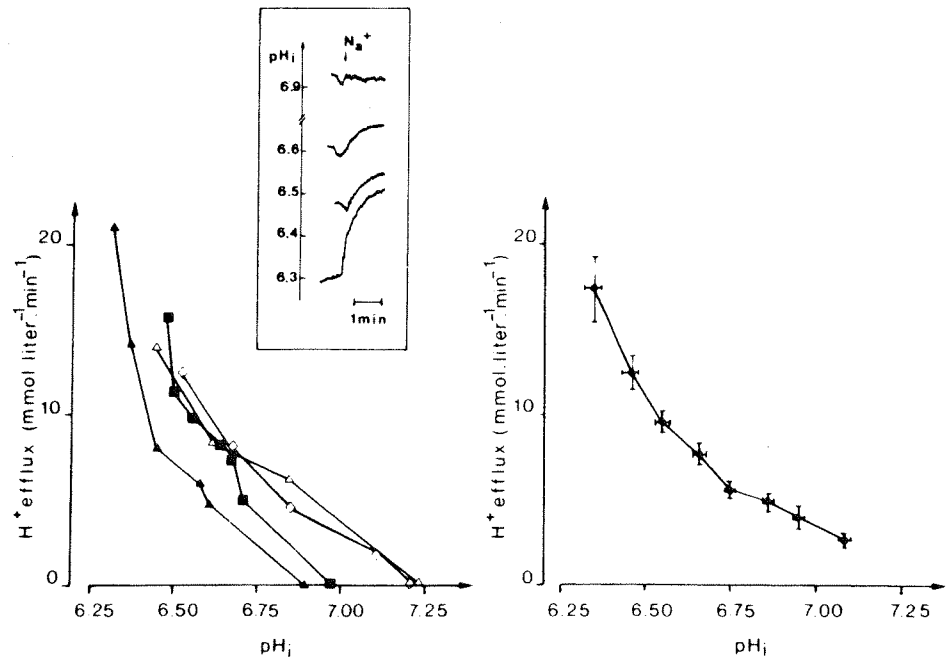
REGULATION DU pH

MECANISMES DE TRANSPORT

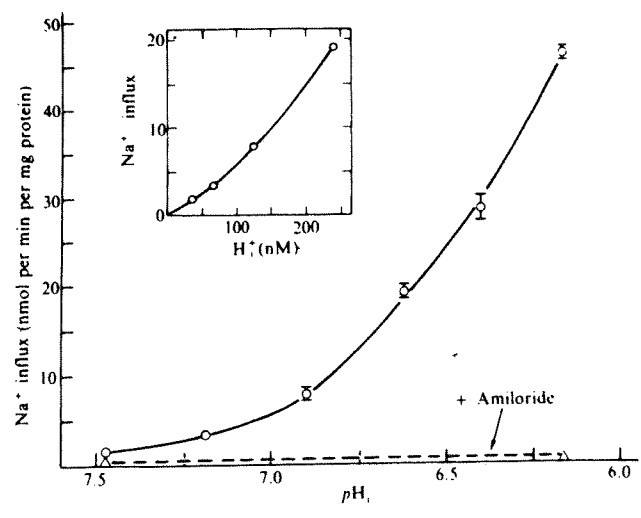
SYSTEMES DE TRANSPORTS ALCALINISANTS

L'échangeur sodium / proton

***Mise en évidence et propriétés générales:**
Sur des cellules de tubule proximal



pH_i



REGULATION DU pH

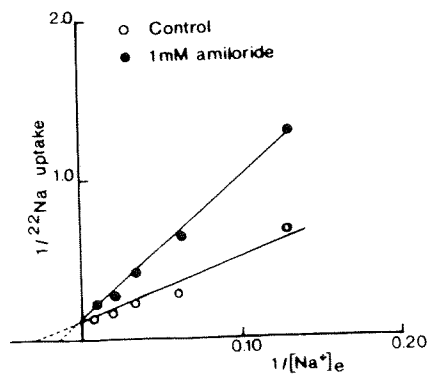
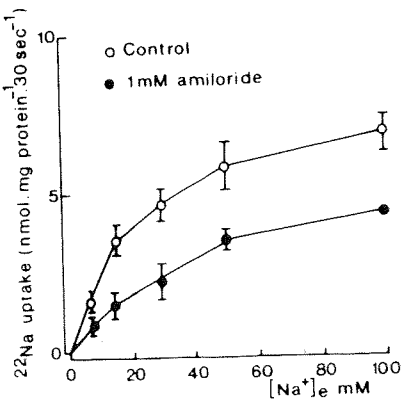
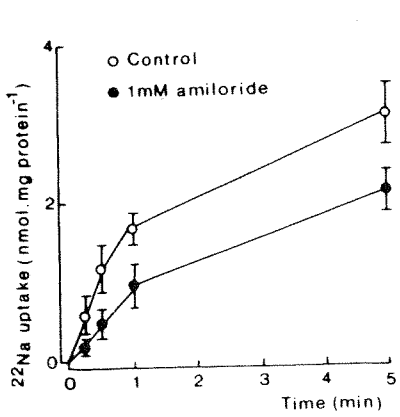
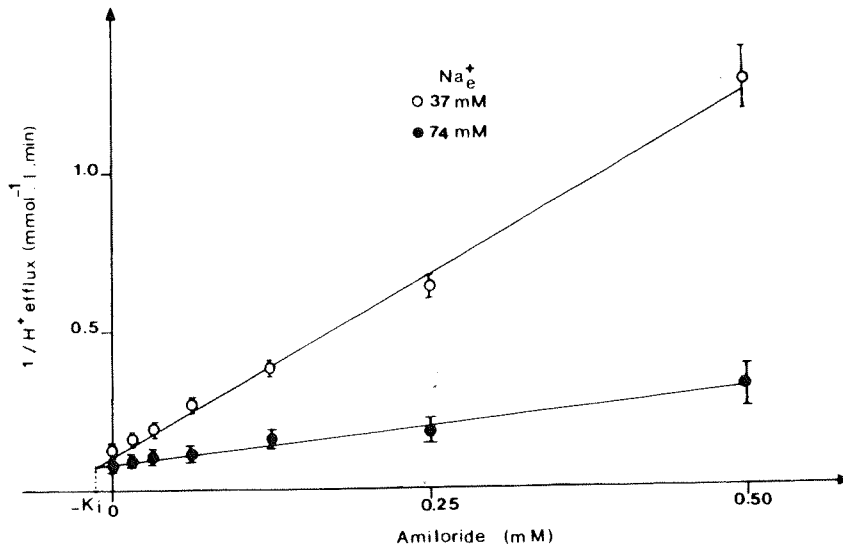
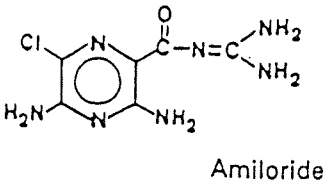
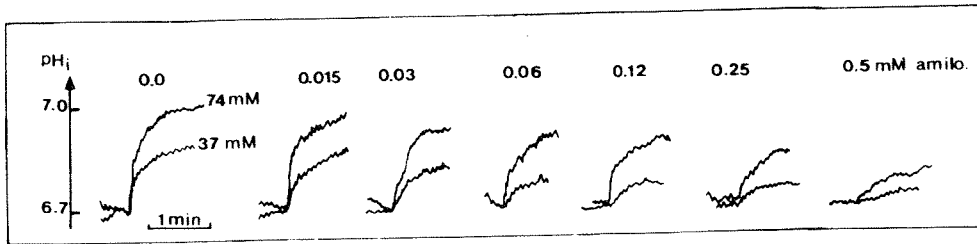
MECANISMES DE TRANSPORT

SYSTEMES DE TRANSPORTS ALCALINISANTS

L'échangeur sodium / proton

***Mise en évidence et propriétés générales:**
Sur des cellules de tubule proximal

Role de l'amiloride



REGULATION DU pH

MECANISMES DE TRANSPORT

SYSTEMES DE TRANSPORTS ALCALINISANTS

L'échangeur sodium / proton

Structure moléculaire

Clonage de l'isoforme NHE1 par une stratégie d'expression dans des fibroblastes TK de souris déficients en NHE et transfectés avec de l'ADN génomique humain. Après transfection les cellules sont soumises à un choc acide : celles qui n'expriment pas NHE meurent, celles qui expriment la forme humaine de NHE résistent. Après obtention de transfectants stables ayant intégré le gène humain de NHE, l'ADN génomique est utilisé pour préparer une banque génomique qui est testée en utilisant une sonde humaine.

Depuis l'obtention de NHE1 on a trouvé quatre autres isoformes.

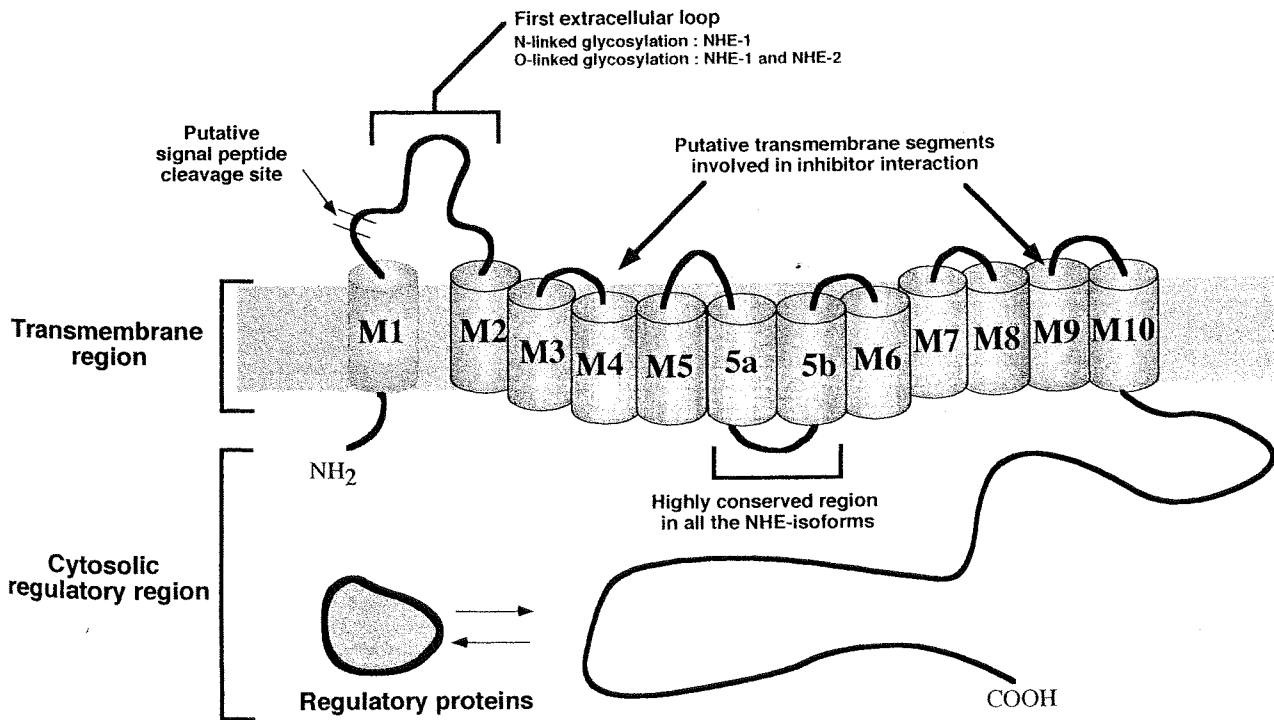


FIGURE 8-1. Topologic model and functional regions of the NHE isoforms.

REGULATION DU pH

MECANISMES DE TRANSPORT

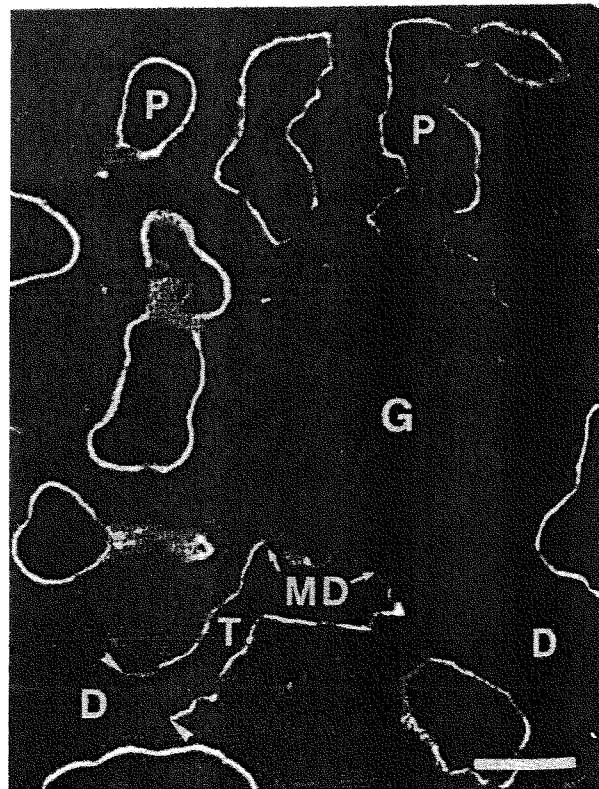
SYSTEMES DE TRANSPORTS ALCALINISANTS

L'échangeur sodium / proton

Les isoformes:

Isoforme	Espèce	Localisation tissulaire	Localisation membranaire
NHE-1	Humain	Ubiquitaire	Plasmique
NHE-2	Humain	Muscle squelettique > colon > rein >> testicules, prostate, ovaire, petit intestin	Apicale ou basolatérale
NHE-3	Humain	Rein >> Petit intestin >> testicules > ovaire > colon = prostate > thymus > leucocyte périphérique > cerveau > rate > placenta	Apicale
NHE-4	Rat	Intestin, Rein, cerveau, estomac	Basolatérale
NHE-5	Humain	Cerveau >> rate, testicule et muscle squelettique	Plasmique

L'isoforme NHE3 est localisée dans la membrane apicale des cellules proximales. Elle est inhibée par l'AMP cyclique.



REGULATION DU pH

MECANISMES DE TRANSPORT

SYSTEMES DE TRANSPORTS ALCALINISANTS (suite)

Les pompes à protons : la H⁺-V ATPase

C'est un transport actif primaire, électrogénique.

Structure:

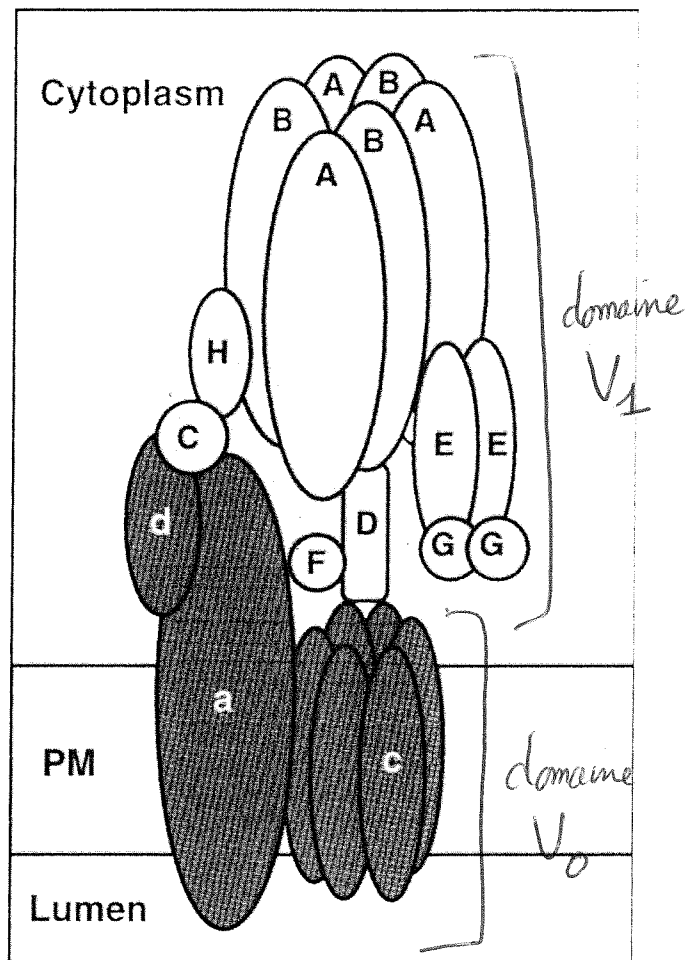


FIGURE 6-1. Diagram illustrating the subunit composition of the mammalian V-H⁺ATPase and the relation of the subunits to each other and to the membrane bilayer. Whereas some of the subunit associations shown are based on experimental data, others are speculative. Subunits that form the transmembrane V₀ sector are solid, and subunits that compose the cytoplasmic V₁ domain are open. The letters within each subunit shape represent the current nomenclature for these subunits. Upper-case letters designate V₁ subunits, whereas lower-case letters are used to designate V₀ subunits. PM, plasma membrane.

REGULATION DU pH

MECANISMES DE TRANSPORT

SYSTEMES DE TRANSPORTS ALCALINISANTS (suite)

Les pompes à protons : la H⁺-V ATPase

Localisation:

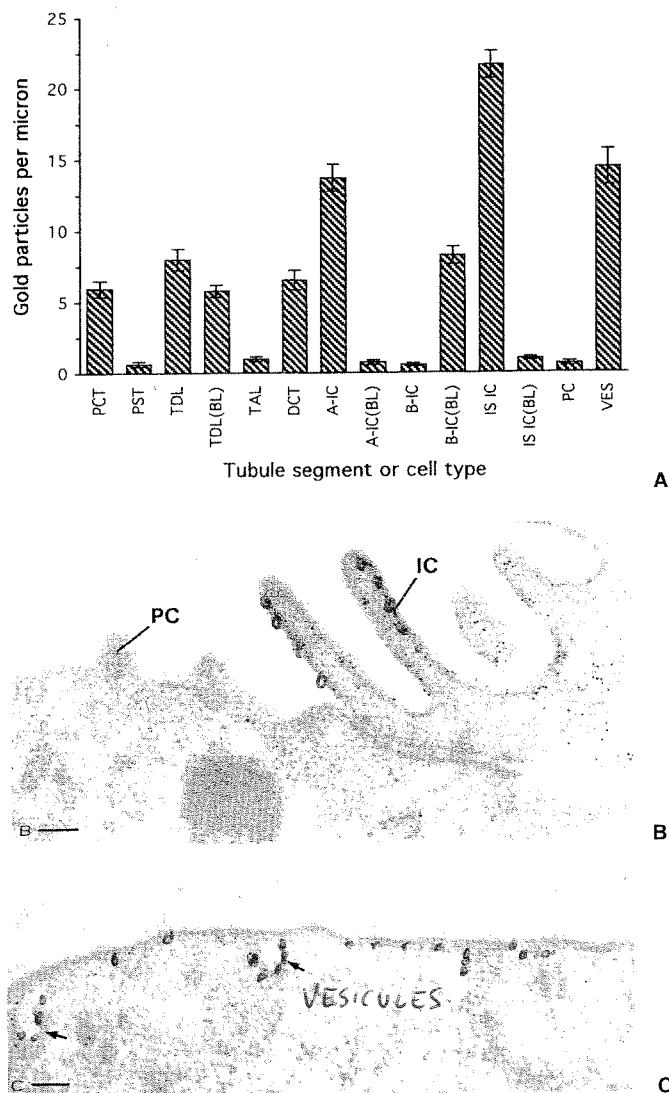


FIGURE 6-4. A: Quantification of the V-H⁺ATPase gold particle labeling of different cell types along the urinary tubule. Results are expressed as the number of gold particles per micrometer of membrane length, and are a measure of the relative amount of V-H⁺ATPase in the plasma membrane of each cell type. Two examples of gold particle labeling of different cell types are shown below the histogram. **B:** A collecting duct with a heavily labeled intercalated cell apical plasma membrane (IC) and a virtually unlabeled principal cell (PC). **C:** The apical membrane of a cell from the distal convoluted tubule. Both the plasma membrane and subapical vesicles are labeled (arrows). PCT, Proximal convoluted tubule; PST, proximal straight tubule (S3 segment); TDL, thin descending limb of Henle; TAL, thick ascending limb of Henle; DCT, distal convoluted tubule; A-IC, cortical A-intercalated cell; B-IC, B-intercalated cell; IS-IC, intercalated cell from inner stripe; PC, principal cell; VES, intracellular vesicles from A-intercalated cell; (BL), basolateral plasma membrane of the corresponding cell type when applicable. Bar = 0.15 μm.

REGULATION DU pH

MECANISMES DE TRANSPORT

SYSTEMES DE TRANSPORTS ALCALINISANTS (suite)

Les pompes à protons : la H⁺-V ATPase

Elle est présente dans le tubule proximal:

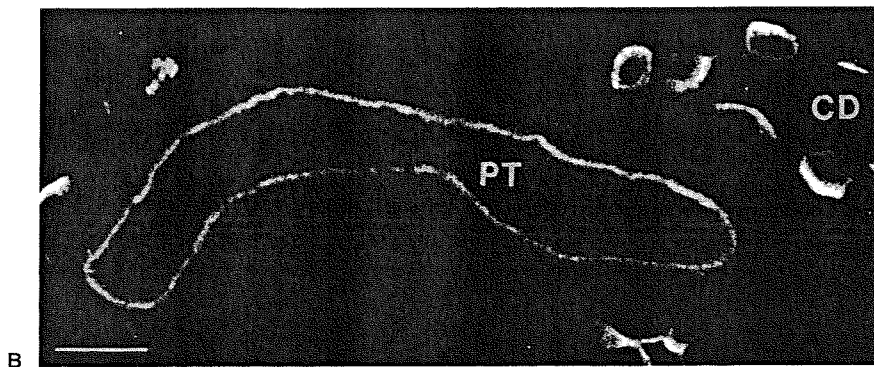


FIGURE 6-5. Localization of the 31-kDa subunit of the V-H⁺ATPase in proximal tubules by immunogold electron microscopy **(A)** and by immunofluorescence microscopy **(B)**. By immunofluorescence, the proton pumps are located in a tight band at the base of the proximal tubule brush border. In the electron micrograph, the gold particles (small arrows) representing sites of proton-pump antigenicity are concentrated in an apical membrane domain that lies between the base of the brush-border microvilli and the clathrin-coated pit domain. With this tissue-preparation procedure, the clathrin coat appears as an electron-lucent band on the cytoplasmic side of the membrane invaginations (large arrows). PT, Proximal tubule; CD, collecting duct. Bar = 0.5 μ m **(A)** and 20 μ m **(B)**.

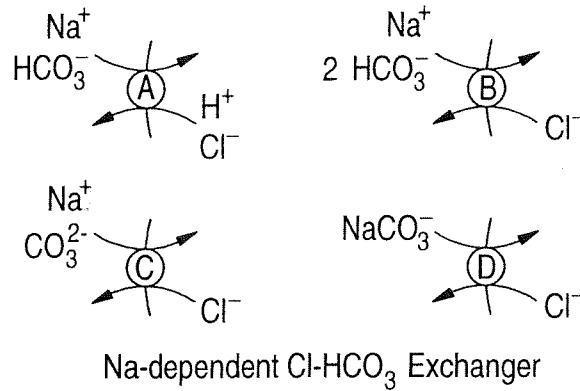
REGULATION DU pH

MECANISMES DE TRANSPORT

SYSTEMES DE TRANSPORTS ALCALINISANTS (suite)

L'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ sensible au Na^+

C'est un transport actif secondaire. Il est localisé dans la membrane basolatérale du tubule proximal et fait rentrer des bicarbonates dans la cellule. On ne connaît pas sa structure moléculaire.



REGULATION DU pH

MECANISMES DE TRANSPORT

SCHEMAS RECAPITULATIFS

Membrane apicale

Membrane basolatérale

Active H Secretion

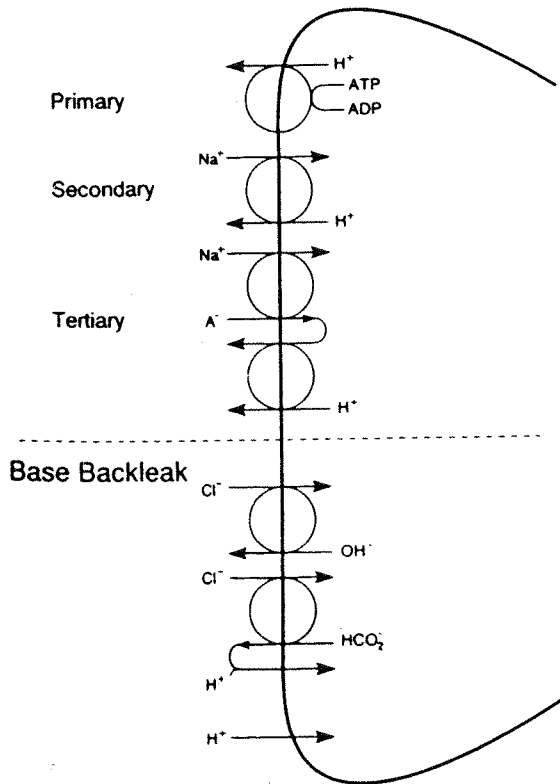


FIGURE 71-3. Apical membrane H transport mechanisms. (From Alpern RJ. Cell mechanisms of proximal tubule acidification. *Physiol Rev* 1990;70:79-114.)

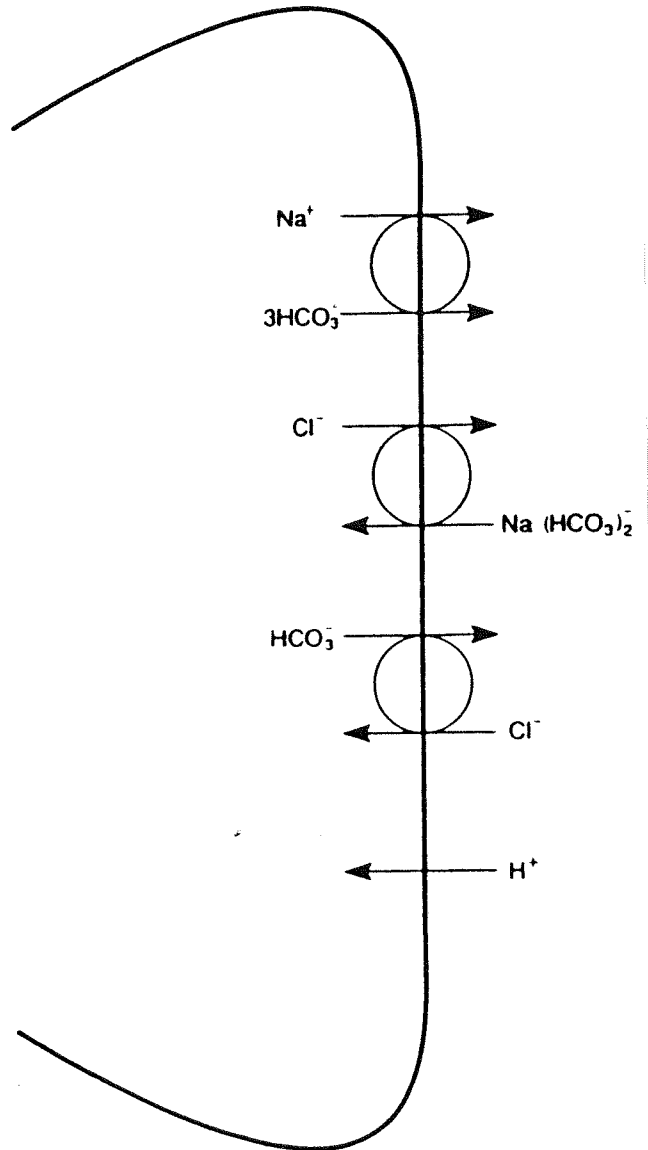


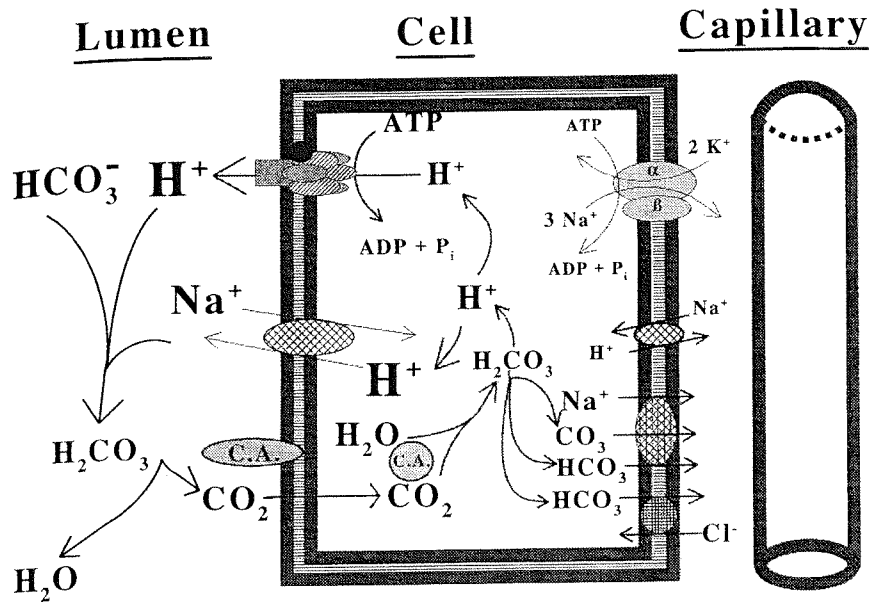
FIGURE 71-5. Basolateral membrane H/HCO_3 transport mechanisms. (From Alpern RJ. Cell mechanisms of proximal tubule acidification. *Physiol Rev* 1990;70:79-114.)

REGULATION DU pH

MECANISMES DE TRANSPORT DES BICARBONATES

Plus des 3/4 des ions H^+ secrétés par le rein, le sont dans le tubule proximal. Ce sont les segments S1 et S2 qui ont la plus grande capacité de sécrétion d'ions H^+ . Cette sécrétion a pour conséquence une réabsorption de HCO_3^- .

Les transporteur d' H^+ situés sur la membrane apicale (H^+ ATPase et antiport Na^+/H^+) contribuent a cette réabsorption de HCO_3^-



REGULATION DU pH

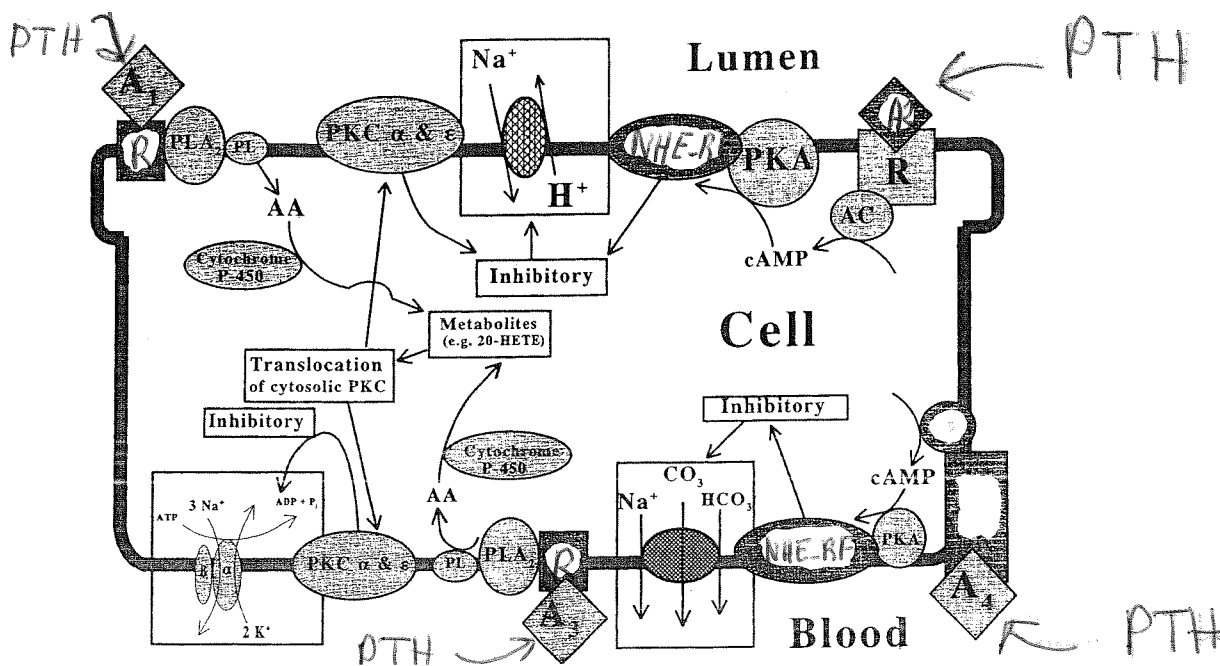
REGULATION DU TRANSPORT DES BICARBONATES

La PTH:

Elle inhibe la réabsorption en diminuant l'activité de l'isoforme NHE3 de l'échangeur Na^+/H^+ , du cotransport $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ et de la Na^+K^+ ATPase.

La PTH stimule la production d'AMPc par un récepteur couplé à l'adénylate cyclase et à la PKA. L'AMPc activerait un facteur de régulation de l'échangeur (NHE-RF) capable d'inhiber l'échangeur Na^+/H^+ et le cotransport $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$.

La PTH stimule aussi la phospholipase A2 avec production d'acide arachidonique qui est ensuite métabolisé par le cytochrome P450. Ces métabolites permettraient la mise en place dans la membrane des isoformes α et ϵ de la PKC qui inhiberaient l'échangeur Na^+/H^+ et la Na^+K^+ ATPase.



REGULATION DU pH

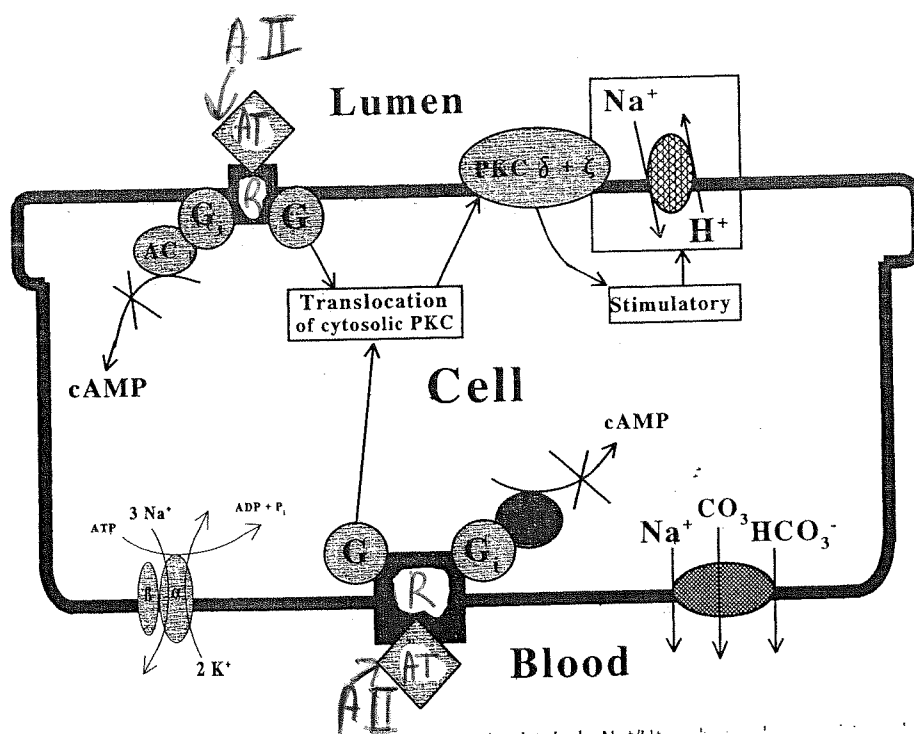
REGULATION DU TRANSPORT DES BICARBONATES

L'angiotensine II (AII)

Elle stimule la réabsorption en augmentant l'isoforme NHE3 de l'échangeur Na^+/H^+ .

L'AII inhibe la production d'AMPc par un récepteur activant une protéine Gi.

L'AII stimule aussi la mise en place dans la membrane des isoformes δ et ζ de la PKC qui activeraient l'échangeur Na^+/H^+ .



**PHYSIOLOGIE DE LA CELLULE DE L'ANSE DE
HENLE**

Cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$

ANSE DE HENLE (partie ascendante large, TAL)

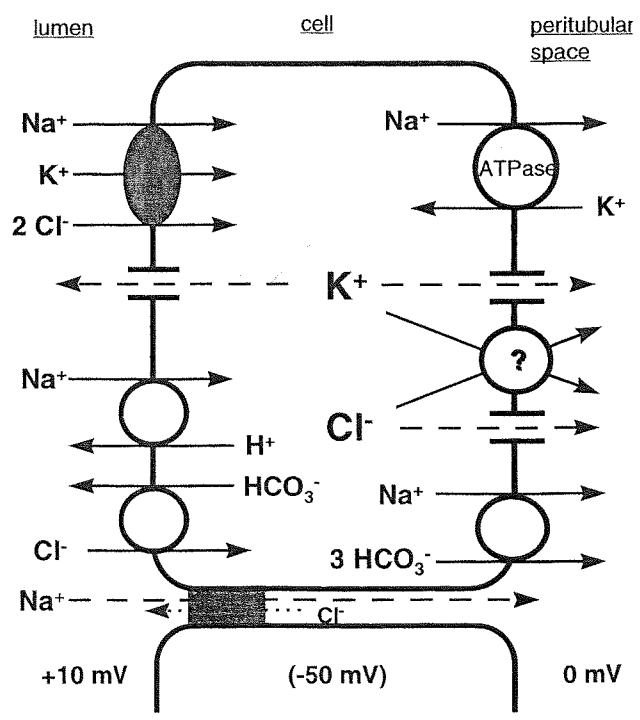
PROPRIETES ELECTROPHYSIOLOGIQUES

	Medullary TALH ^a	Cortical TALH ^b
Transepithelial voltage (mV)	+3-+7	+5-+8
Transepithelial resistance (Ωcm^2)	25-35	10-25
Basolateral membrane voltage (mV)	-65--70	-50--80
Apical membrane resistance (Ωcm^2)	88	57
Basolateral membrane resistance (Ωcm^2)	47	21
Paracellular resistance (Ωcm^2)	47	37
Intracellular ion activities (mEq/liter)		
Cl ⁻	22	
K ⁺	115	

^a Data obtained in the mouse.
^b Data obtained in the rabbit.

REABSORPTION DE NaCl

La réabsorption nette de sels dans ce segments induit un potentiel transépithélial positif dans la lumière tubulaire. Dans ces conditions le transport de Cl⁻ va se faire contre un gradient électrochimique et va donc nécessiter un procédé actif.

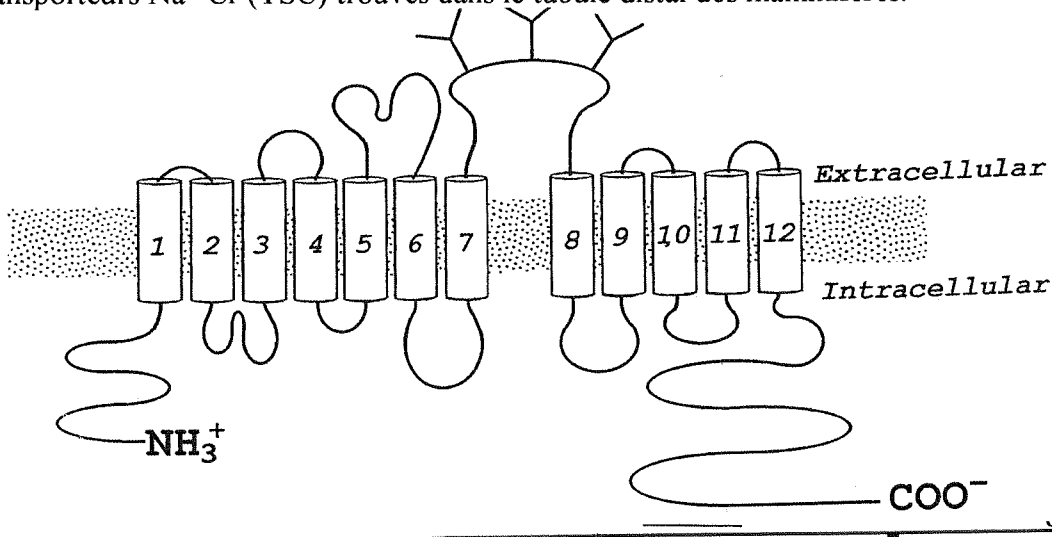


ANSE DE HENLE (partie ascendante large, TAL)

CO-TRANSPORTEUR $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ (NKCC)

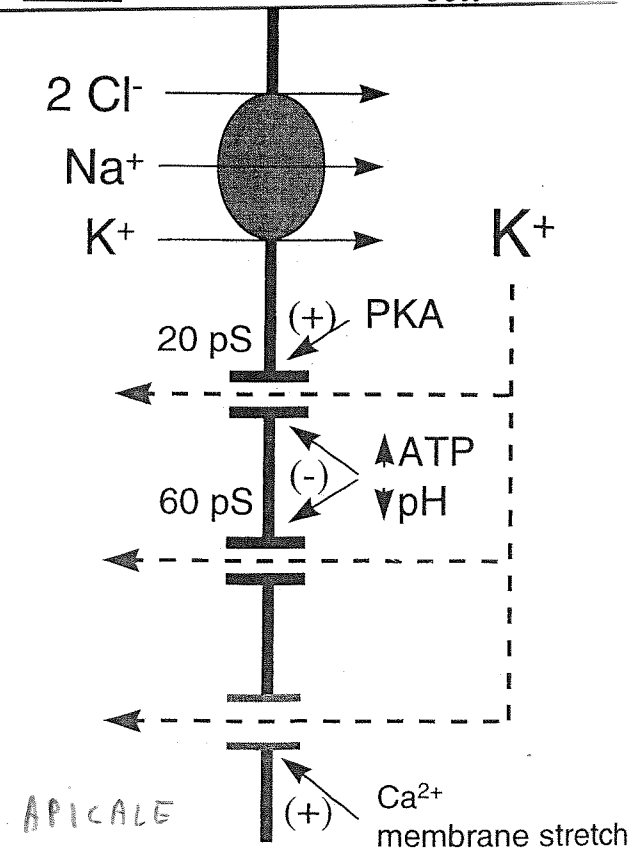
L'entrée apicale de Cl^- se fait par un cotransport $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ électroneutre (NKCC). C'est le gradient de Na^+ favorable qui permet son fonctionnement. Ce transporteur est inhibé par le furosémide, et le bumétanide. Il a été démontré pour la première fois par Greger et coll en 1985 sur de la TAL perfusée in vitro. Il fonctionne en parallèle avec un canal K^+ apical qui permet le recyclage du K^+ . Au niveau basolatéral la sortie de Na^+ se fait par la Na/K ATPase et par un cotransport Na/HCO_3^- . Le K^+ et le Cl^- sortent par des canaux et peut-être par un co-transporteur KCl.

Deux isoformes principales de NKCC ont été identifiées. Le gène NKCC est relié à la famille des cotransporteurs Na^+-Cl^- (TSC) trouvés dans le tubule distal des mammifères.



CANAUX K^+ APICAUX

Ils pourraient appartenir à la famille ROMK



ANSE DE HENLE (partie ascendante large, TAL)

REGULATION DE LA REABSORPTION DE NaCl

Hormone anti-diurétique (ADH) :

*L'ADH augmente la réabsorption de NaCl dans le mTAL. Il y aurait augmentation du nombre de co-transporteurs $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ dans la membrane apicale. Cet effet se ferait par l'intermédiaire de récepteurs V2 avec production d'AMP cyclique. De plus, il se pourrait que l'ADH augmente également la conductance K^+ apicale et la conductance Cl^- basolatérale.

Isoproterenol et agonistes adrénergiques β :

*Augmentent également la réabsorption de NaCl selon un mécanisme voisin de celui de l'ADH

Aldostérone:

*Il existe des récepteurs le long du TAL. L'aldostérone augmente la réabsorption de NaCl par un effet relié à une augmentation de l'activité de la Na/K ATPase.

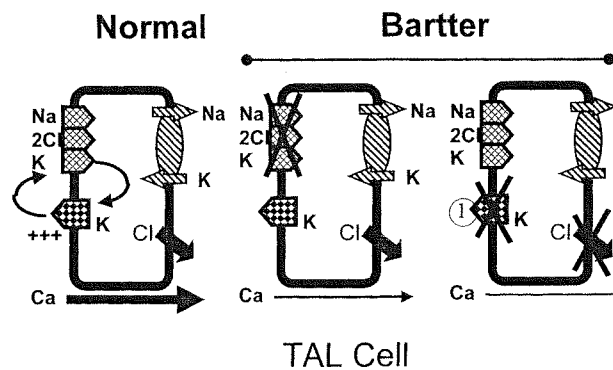
Prostaglandine E2:

*Elle réduit le transport de NaCl uniquement dans la partie médullaire du TAL et seulement en présence d'ADH. En fait, PGE2 participerait à un mécanisme de feed-back qui modulerait l'effet de l'ADH. L'ADH stimule la production médullaire de PGE2 qui à son tour bloque l'action de l'ADH sur la réabsorption de NaCl. L'interaction ADH-PGE2 se ferait au niveau de l'adényl cyclase. PGE2 inhibe la production d'AMPc par une stimulation d'un sous unité inhibitrice sur le système adényl- cyclasique.

MALADIES TOUCHANT LE Na/K/2Cl

SYNDROME DE BARTTER

Le terme syndrome de Bartter est utilisé pour décrire des désordres génétiques de la fonction tubulaire rénale caractérisés par une hypokaliémie avec alcalose métabolique. On distingue trois types conduisant aux mêmes symptômes. Type I: mutation du Na/ K /2Cl (NKCC2); Type II :mutation dans le gène codant pour le canal K⁺ ROMK; Type III: mutation dans le gène codant pour le canal Cl⁻ CIC KB.



COMPARISON OF BARTTER'S SYNDROME AND THE EFFECTS OF LOOP DIURETICS

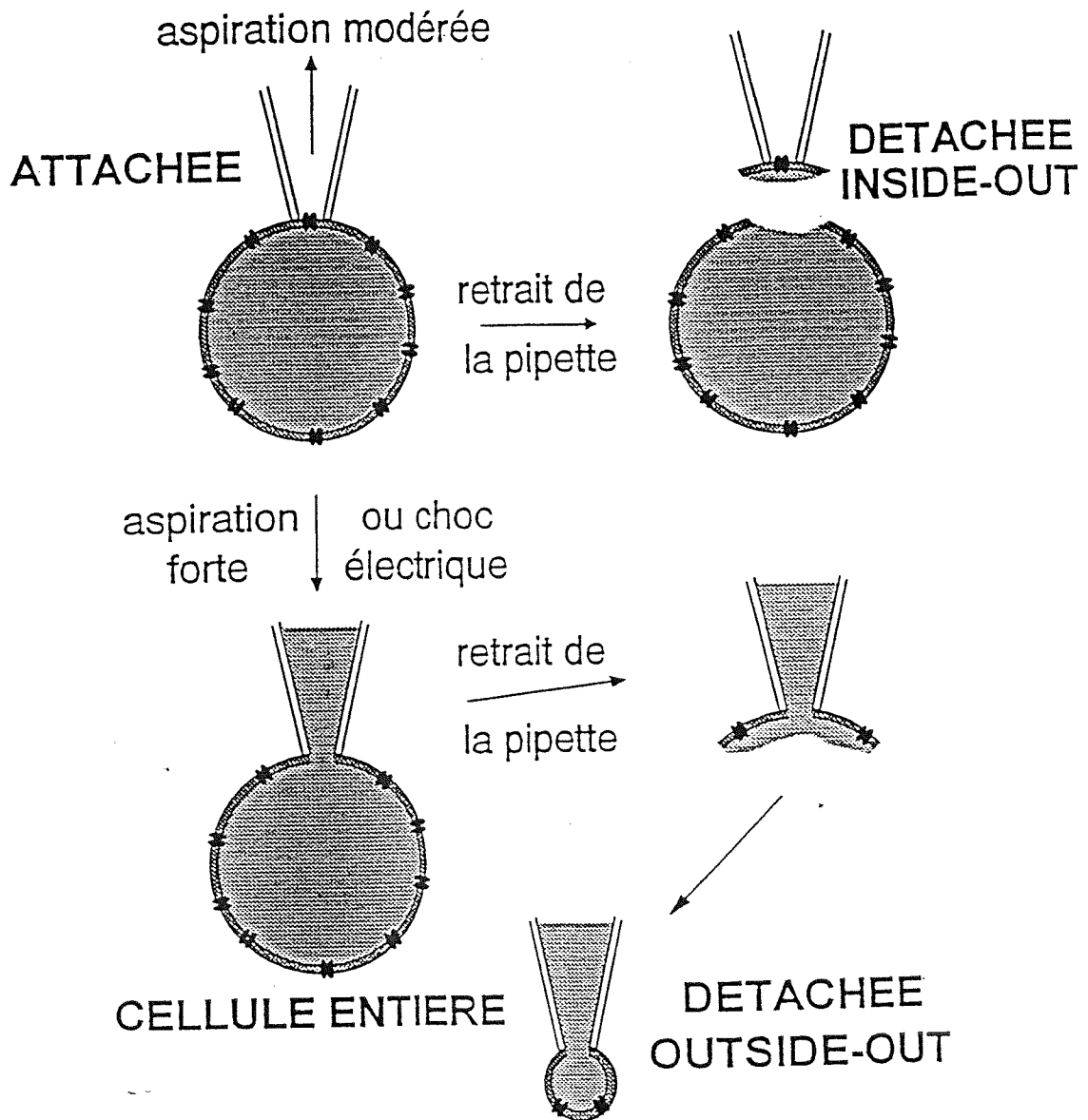
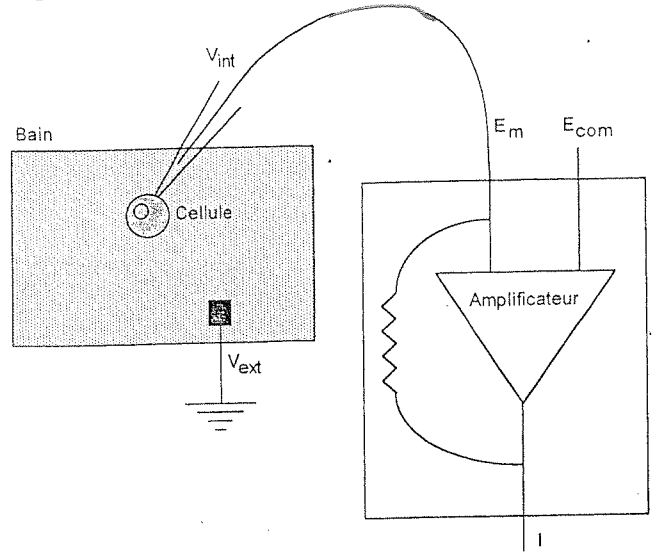
Loop diuretics	Bartter's syndrome
Salt wasting	Salt wasting
Hypokalemia	Hypokalemia
Alkalosis	Alkalosis
Hypercalciuria	Hypercalciuria
High plasma renin activity and aldosterone	High plasma renin activity and aldosterone
Na/K/Cl inhibition	Na/K/Cl mutation

**PHYSIOLOGIE DES CELLULES DISTALES ET
DU CANAL COLLECTEUR**

Transport de Na⁺

RAPPELS SUR LA TECHNIQUE DU PATCH CLAMP

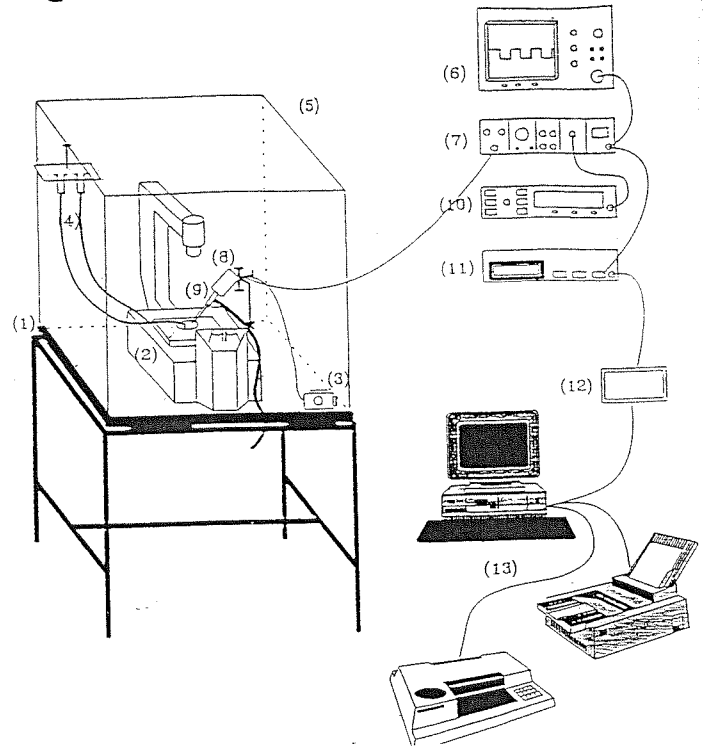
Le patch clamp est l'approche expérimentale qui permet de mesurer in situ les fluctuations de courant générées par des canaux ioniques



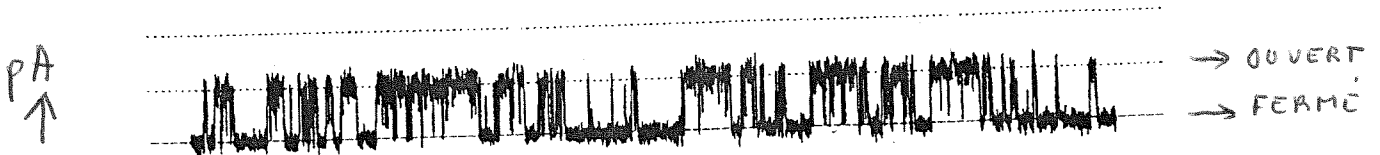
RAPPELS SUR LA TECHNIQUE DU PATCH CLAMP

DISPOSITIF EXPERIMENTAL

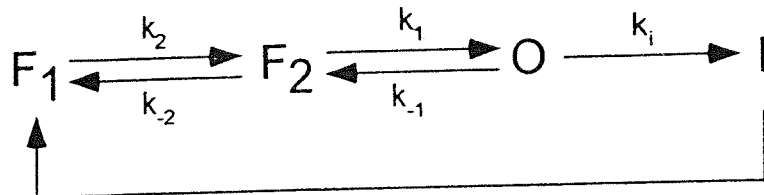
Figure 2 : schéma du dispositif expérimental utilisé dans la technique du patch-clamp. (1) table antivibrations, (2) microscope inversé, (3) micromanipulateur hydraulique, (4) système de perfusion du bain, (5) cage de Faraday, (6) oscilloscope, (7) amplificateur, (9) porte électrode, (10) stimulateur, (11) enregistreur, (12) interface, (13) ordinateur et ses périphériques.



CANAL UNITAIRE

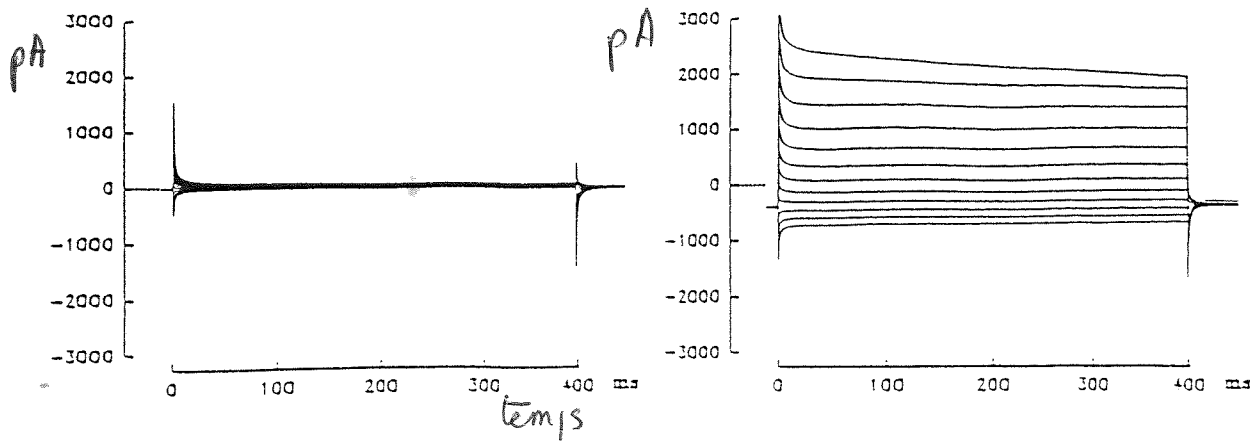


Cinétique



F1, F2 : états fermés, O : état ouvert, le canal laisse passer le courant, il peut repasser dans un état fermé ou un état inactivé (I).

COURANTS TOTAUX (whole-cell)



RAPPELS SUR LA TECHNIQUE DU PATCH CLAMP

CONFIGURATIONS

Configurations	Avantages	Inconvénients
<i>Cellule-attachée</i>	- Milieu interne de la cellule conservé - Mesure de courant unitaire	- Potentiel transmembranaire inconnu - Milieu interne non contrôlé
<i>Patch excisé</i>	- Milieux interne et externe parfaitement contrôlés - Mesure de courant unitaire	- Perte d'éventuels facteurs régulateur du canal
<i>Cellule-entière</i>	- Milieu externe parfaitement contrôlé - Milieu interne relativement bien contrôlé - Mesure d'un courant global	- Perte d'éventuels facteurs de régulation du canal
<i>Patch perforé</i>	- Cellule moins abîmée - Milieu interne de la cellule préservé - Mesure d'un courant global - Milieu externe parfaitement contrôlé	- La perforation est lente - Mise au point nécessaire pour certaines cellules - Milieu interne non contrôlé

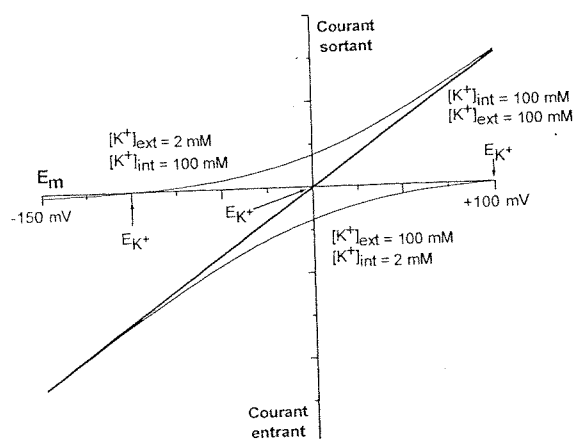
RELATIONS COURANT-POTENTIEL (courbes I-V)

Elles indiquent si le canal n'obéit qu'à la loi de l'électrodifusion ou bien s'il y a une diffusion facilitée qui va augmenter la conductance. La pente de la courbe I-V donne la conductance (loi d'Ohm)

Exemple des canaux K^+ :

Canaux de fond : n'obéissent qu'à la loi de l'électrodifusion La courbe IV est représentée par l'équation de Goldman-Hodgkin et Katz:

$$I_{ion} = P_{ion} \cdot z^2 \cdot \frac{E_m \cdot F^2}{R \cdot T} \cdot \frac{[ion]_{int} - [ion]_{ext} \cdot \exp(-z \cdot \frac{E_m \cdot F}{RT})}{1 - \exp(-z \cdot \frac{E_m \cdot F}{RT})}$$

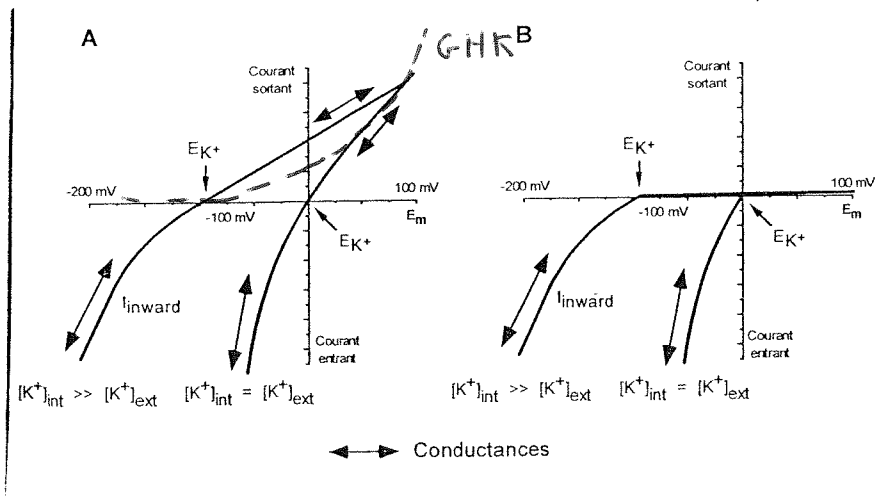


RAPPELS SUR LA TECHNIQUE DU PATCH CLAMP

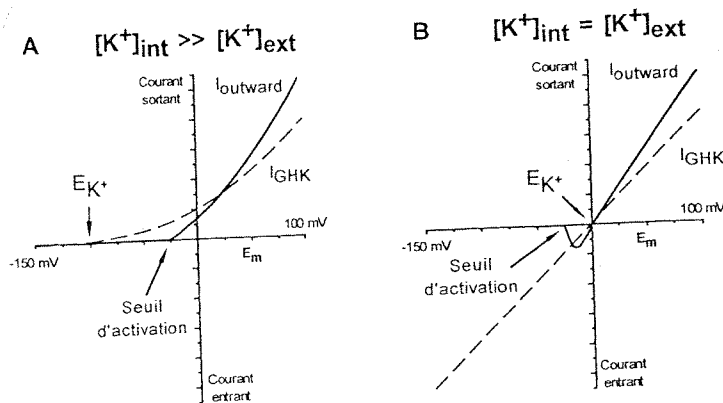
RELATIONS COURANT-POTENTIEL (courbes I-V)

Exemple des canaux K^+ :

Canaux à rectification entrante



Canaux à rectification sortante



REABSORPTION DISTALE DE SODIUM

LES CANAUX Na⁺

BIOPHYSICAL PROPERTIES OF NA-CONDUCTING CHANNELS IN RENAL EPITHELIA

	Conductance (pS)	Selectivity P _{Na} /P _K	Open Time/Closed Time (msec)	Amiloride K ₁ (μM)
Highly selective	4-5	>10	400-4000/1000-4000	0.1
Rat CCT (193)				
Rabbit PST (92)				
Toad urinary bladder (78)				
Ambystoma CT (239)				
Rabbit CCT (1° culture) (160)				
Rat IMCD (1° culture) (260)				
A6 cells (filters) (105)				
M1 cells (32, 144)				
α,β,τ-ENaC (oocytes) (27)				
Poorly selective	9-20	3-6	40-50/100	1
Rabbit CCT (1° culture) (160)				
A6 Cells (plastic) (104)				
LLC-PK1 cells (29)				
Nonselective cGMP-sensitive	28	1	40/50	0.1
Rat IMCD (1° culture) (152)				
Nonselective Ca-dependent	20-25	1	Complex kinetics	Insensitive
Rat CCT (196)				
M1 cells (139)				
Nonselective Ca-blockable	120-180	1	ND	Insensitive
Toad urinary bladder (3, 55)				
Nonselective stretch-activated	25-35	1	3-4/2,200-800	>30
<i>Necturus</i> proximal tubule (66)				
Opossum kidney cells (248)				

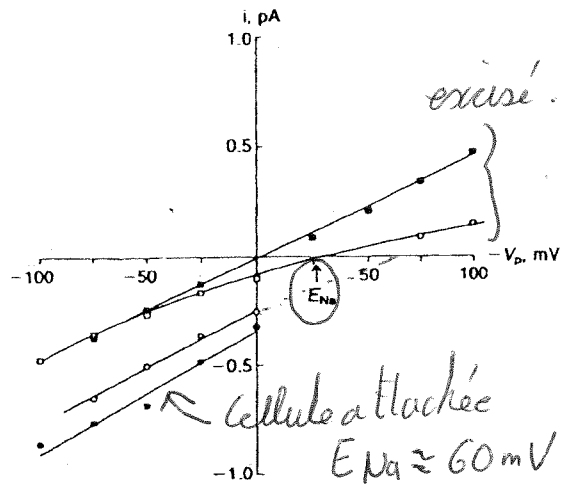
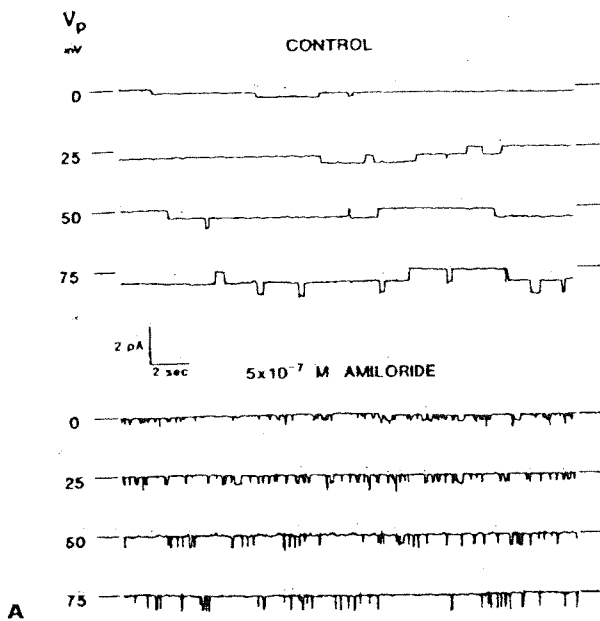
IMCD, inner medullary collecting duct; CCT, cortical collecting tubule; PST, proximal straight tubule; ND, not done.

REABSORPTION DISTALE DE SODIUM

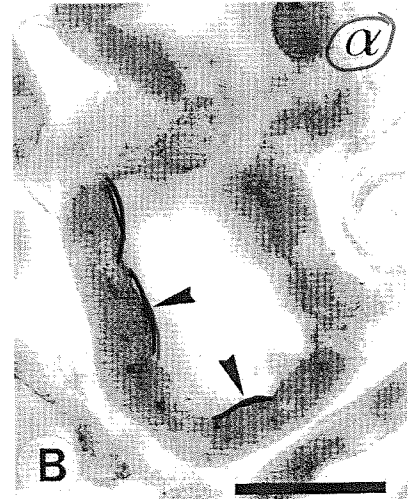
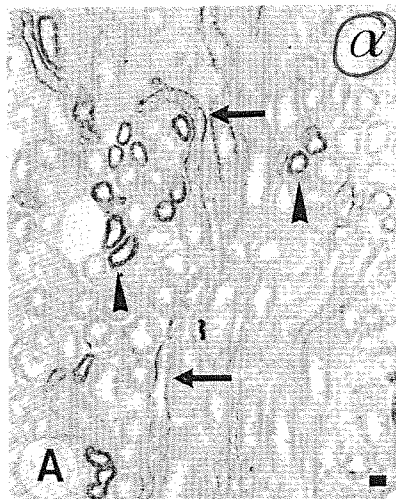
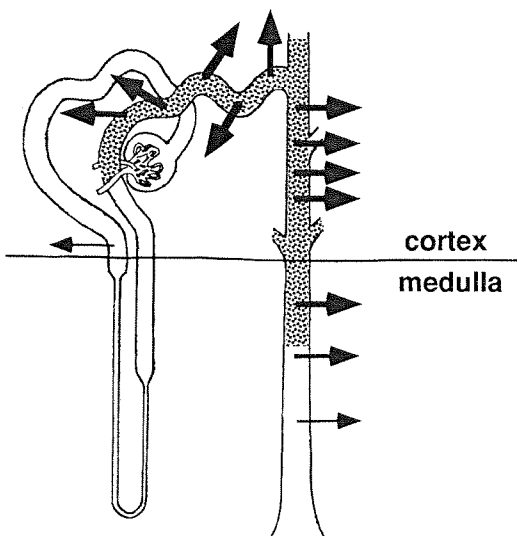
LES CANAUX Na⁺

ENaC: Mesuré dans le CCT (MEMBRANE APICALE).

Electrophysiologie



Localisation



immunofluorescence avec α ENaC

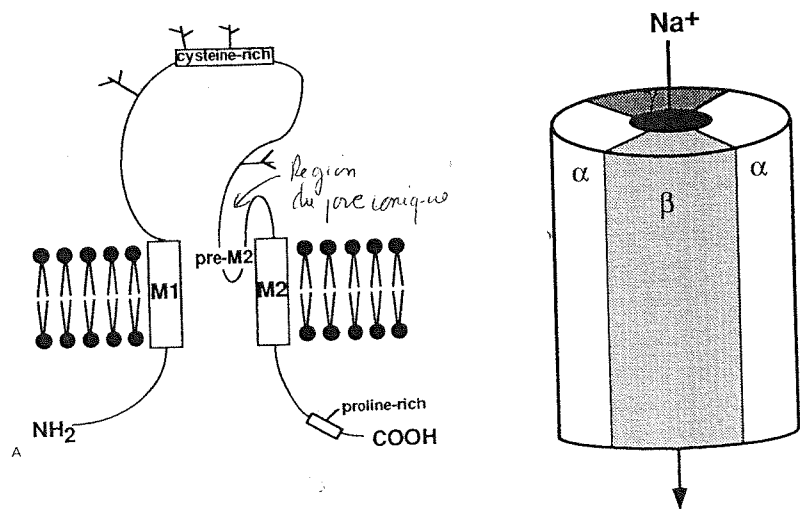
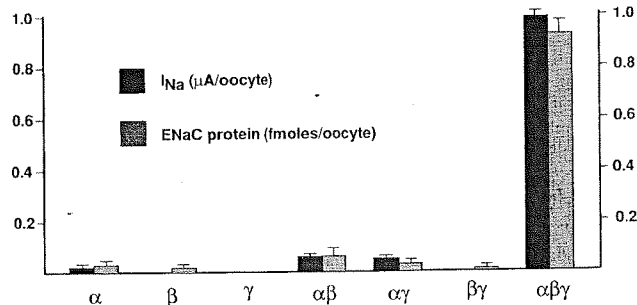
REABSORPTION DISTALE DE SODIUM

LES CANAUX Na^+

Clonage de ENaC

3 sous unités (α, β, γ) ont été clonées à partir du colon de rat. Par expression dans des ovocytes de Xénope il a été montré que :

La co-expression de $\alpha\beta$ ou $\alpha\gamma$ ENaC induit une faible conductance au Na^+ mais la co-expression $\alpha\beta\gamma$ donne une conductance maximale. **Le canal est un hétéro-oligomère formé de 3 polypeptides.**

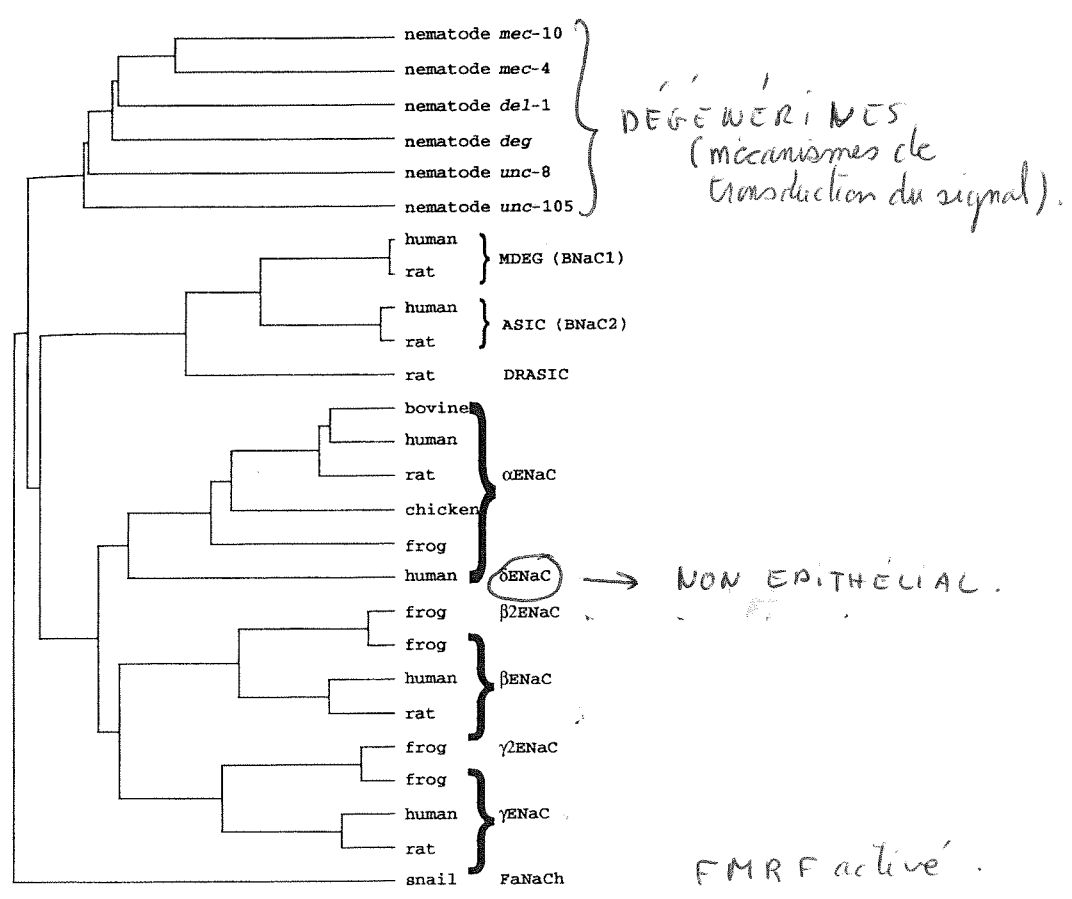


Structural features of Na channel. **A:** The proposed topology of the ENaC protein with cytoplasmic N- and C-termini, two membrane-spanning domains, and a large extracellular loop. The pre-M2 region may form part of the conducting pore. **B:** Proposed arrangement of ENaC subunits around the conducting pore. Possible stoichiometry of $2\alpha:1\beta:1\gamma$ is illustrated (68). Other studies indicated a stoichiometry of $3\alpha:3\beta:3\gamma$ (226).

REABSORPTION DISTALE DE SODIUM

LES CANAUX Na⁺

Arbre phylogénique des ENaC



REABSORPTION DISTALE DE SODIUM

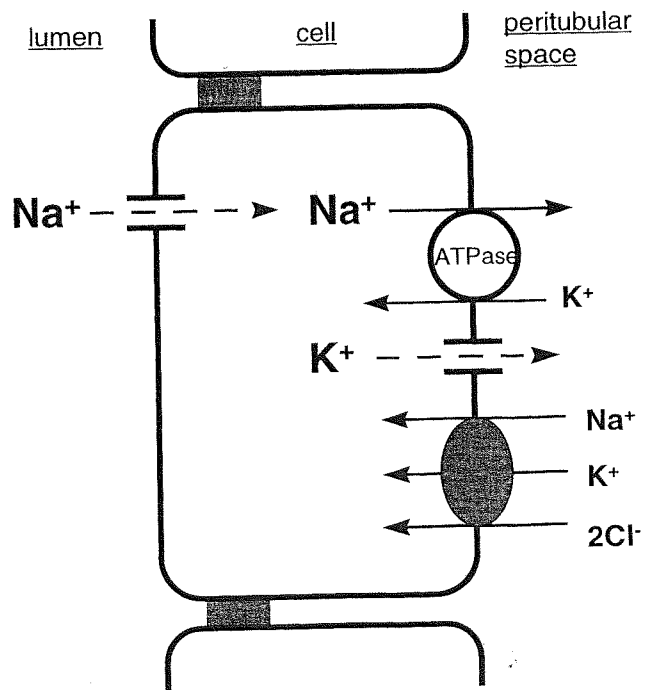
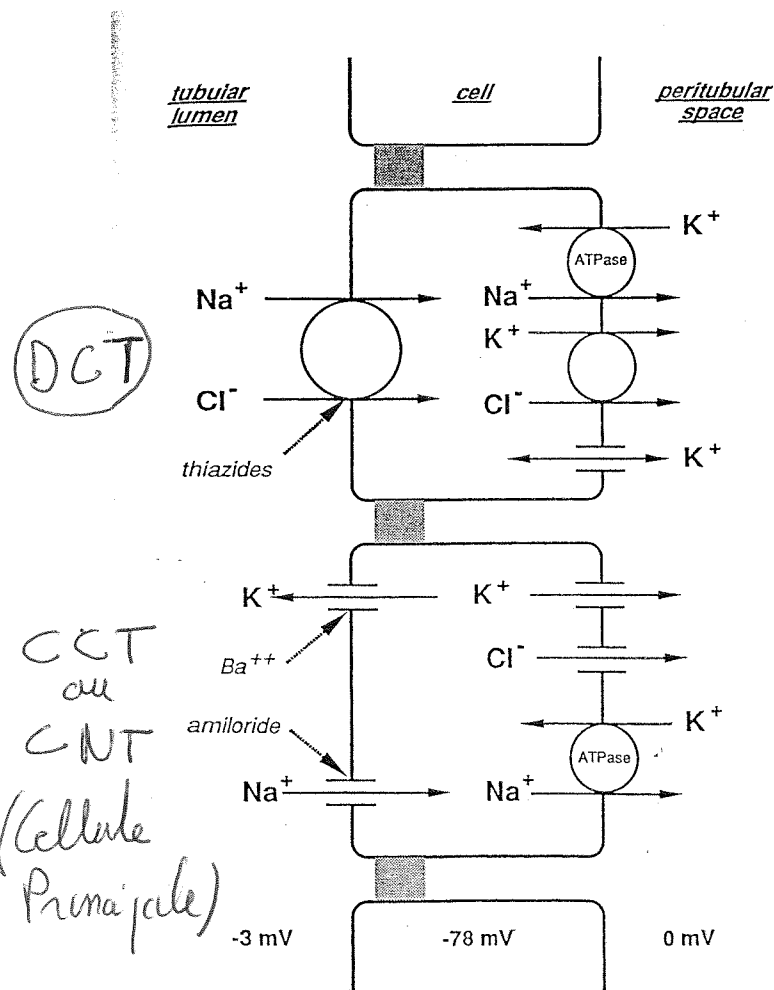
LES CANAUX Na⁺

Autres canaux perméables au Na⁺ :
Voir table précédente

AUTRES MECANISMES DE TRANSPORT

Co-transport NaCl : forte homologie avec Na/K/2Cl de l'anse, localisé dans la membrane apicale du tubule distal précoce, bloqué par les dérivés des thiazides.

SCHEMA DE LA REABSORPTION DE Na⁺



Canal collecteur médullaire

REABSORPTION DISTALE DE SODIUM

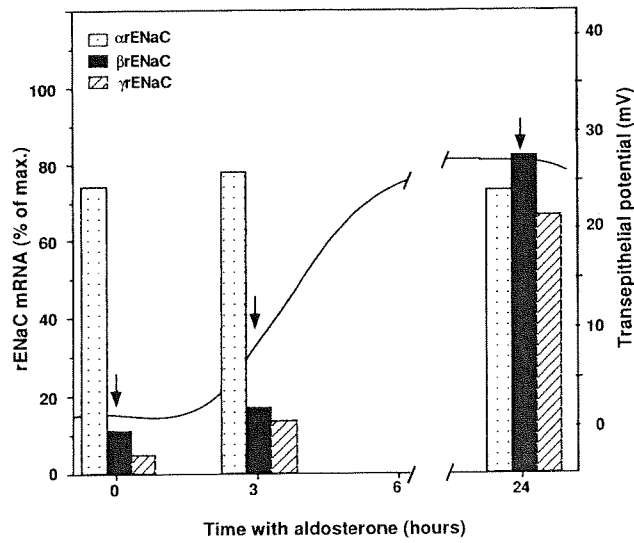
REGULATION OF EPITHELIAL Na CHANNELS

	Channel Activity	Effect	Mechanism	Reference
Hormones				
Aldosterone				
A6 (early)	Increase	P _o	Protein synthesis	127
CCT (late)	Increase	N	Protein synthesis	182
Antidiuretic hormone	Increase	N	Cyclic adenosine monophosphate	170
Insulin	Increase	P _o	Tyrosine kinase?	171
ANF	Decrease	P _o	Cyclic guanosine monophosphate/PKG	151
Environmental factors				
Hyperpolarization	Increase	P _o	Direct?	197
Membrane stretch	Increase	P _o	Direct?	121, 129
Luminal Na	Decrease	P _o	Direct?	81, 200
Cytoplasmic Na	Decrease	P _o	G-protein	138
Cytoplasmic Ca	Decrease	?	Direct?	86
Cytoplasmic Ca ²⁺	Decrease	P _o	PKC?	21, 159, 225
Cytoplasmic H ⁺	Decrease	P _o	Direct?	108, 195

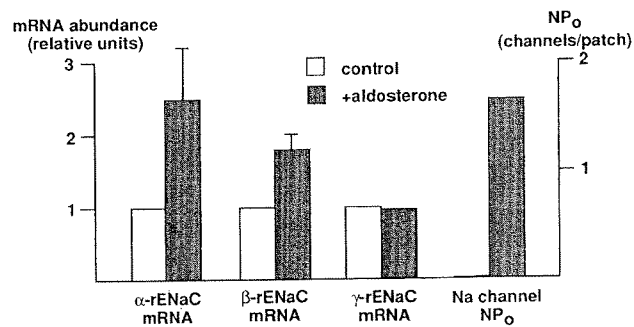
REABSORPTION DISTALE DE SODIUM

REGULATION DES CANAUX ENaC

Aldostérone: Dans le colon, l'aldostérone augmente les sous-unités β et γ alors que α est peu touchée. L'effet est génomique.



Dans le rein, l'aldostérone augmente surtout α et β



ADH :

L'effet est rapide, l'ADH augmente le nombre de canaux par l'intermédiaire des récepteurs V2 et de l'AMPC. L'hormone pourrait favoriser la mise en place de canaux dans la membrane à partir d'un pool intracellulaire.

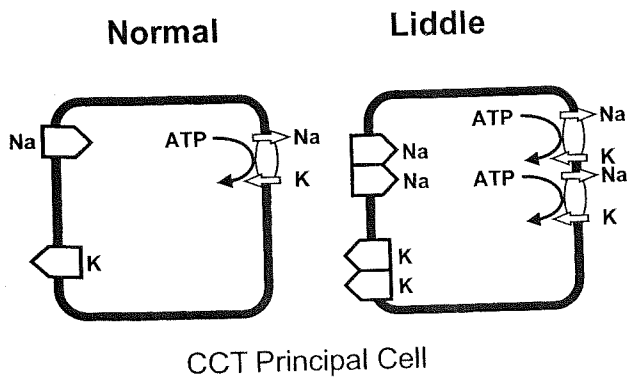
MALADIES TOUCHANT LE TRANSPORT DISTAL DE SODIUM

SYNDROME DE LIDDLE

Le syndrome de Liddle (pseudo-aldostéronisme) est une forme autosomale dominante d'hypertension chez l'homme.

Il y a une hyper-réabsorption distale de Na^+ qui serait due à une hyper-activité des canaux ENaC.

La principale mutation serait la présence d'un codon stop qui produit la délétion de 45 acides aminés sur la queue C-terminale de la sous unité β ENaC ou la sous unité γ ENaC. Ces sous-unités pourraient avoir un rôle régulateur négatif du canal en diminuant la surface d'expression membranaire du canal. Leur troncation lèverait cette inhibition. Ainsi la mutation de Liddle augmente le nombre de canaux membranaires apicaux induisant une augmentation de la réabsorption de Na^+ et une prédisposition à l'hypertension.

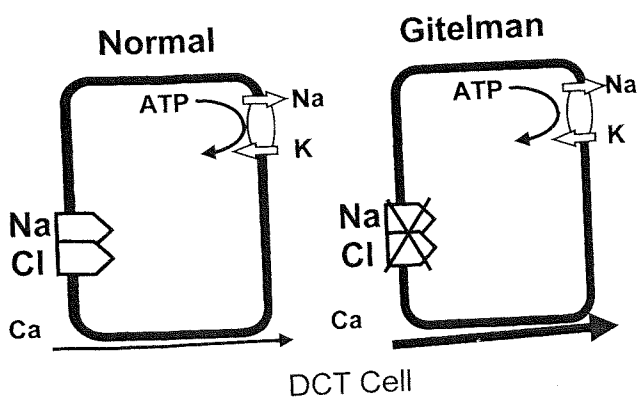


COMPARISON OF LIDDLE'S SYNDROME AND HYPERALDOSTERONISM

Hyperaldosteronism	Liddle's syndrome
Salt retention	Salt retention
Hypokalemia	Hypokalemia
Hypertension	Hypertension
High aldosterone	Low aldosterone
Low plasma renin activity	Low plasma renin activity
High CCT function	Na channel mutation

SYNDROME DE GITELMAN

Identique au syndrome de Bartter (voir anse de Henle) mais touche le Na-Cl cotransporteur.



COMPARISON OF GITELMAN'S SYNDROME AND THE EFFECTS OF THIAZIDE DIURETICS

Thiazide diuretics	Gitelman's syndrome
Salt wasting	Salt wasting
Hypokalemia	Hypokalemia
Alkalosis	Alkalosis
Hypocalciuria	Hypocalciuria
High plasma renin activity and aldosterone	High plasma renin activity and aldosterone
Na/Cl inhibition	Na/Cl mutation

COMPARISON OF BARTTER'S SYNDROME AND GITELMAN'S SYNDROME

Bartter's syndrome	Gitelman's syndrome
Salt wasting	Salt wasting
Hypokalemia/alkalosis	Hypokalemia/alkalosis
Childhood	Adulthood
Hypercalciuria	Hypocalciuria
High plasma renin activity and aldosterone	High plasma renin activity and aldosterone
Na/K/Cl mutation	Na/Cl mutation

**PHYSIOLOGIE DES CELLULES DISTALES ET
DU CANAL COLLECTEUR**

Transport de K^+

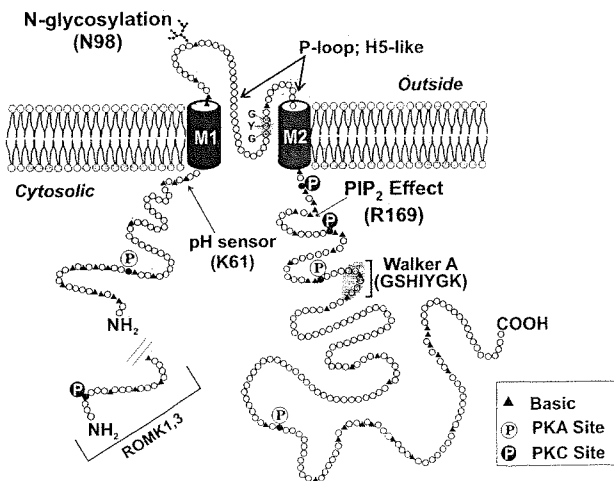
TRANSPORT DE POTASSIUM

La régulation de l'excrétion rénale de K^+ dépend du fonctionnement coordonné de transporteurs, de pompes et de canaux ioniques sélectifs localisées dans les membranes apicales et basolatérales. Ces mécanismes ont principalement lieu le long des segments terminaux du néphron. Les canaux perméables aux K^+ ont un rôle clef dans cette régulation:

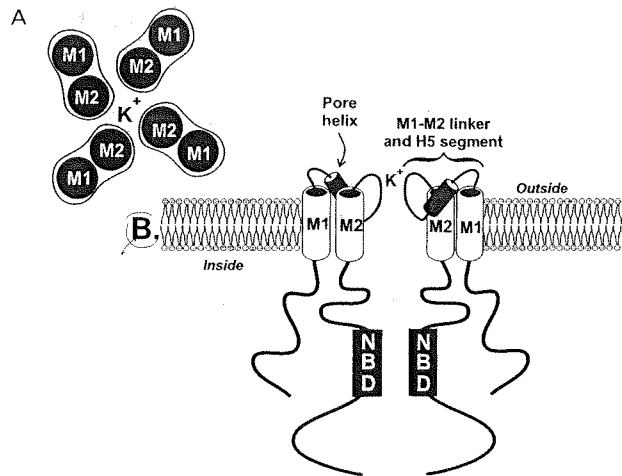
- *Il jouent un rôle dans le maintien du potentiel cellulaire.
- *Il participent à la régulation du volume cellulaire.
- *Il permettent le recyclage du K^+ pour le maintien de l'activité de la Na K ATPase
- *Ils sont impliqués dans la sécrétion de K^+ par les canaux collecteurs corticaux.

SECRETION DISTALE DE K^+

Biologie moléculaire: Ce sont des canaux de type ROMK qui appartiennent à la famille des canaux K^+ à rectification entrante (K_{IR}).



Topology of ROMK ($K_{IR1.1}$) K^+ channel. M1 and M2 represent the two membrane-spanning domains characterizing the inward-rectifier family of potassium channel. Some important functional sites are indicated. A short amphipathic segment in the M1-M2 linking segment in ROMK is homologous to the pore-forming (P loop) or H5 region of classic voltage-gated *Shaker* K^+ channels cloned from the fruit fly. The canonical G-Y-G amino acid sequence found in all K^+ channels is shown in the H5 segment.

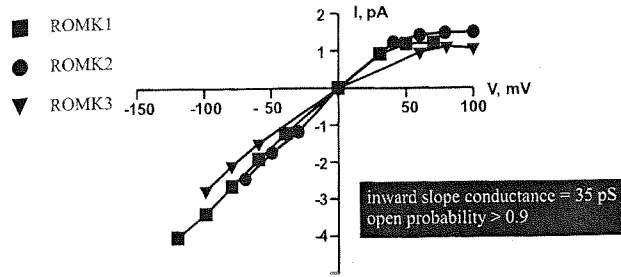


Multimeric structure of the K_{IR} family. **A:** ROMK, like all K_{IR} channels, are formed from a tetrameric assembly of subunits. M2 segments line the channel pore and are surrounded by M1 segments that also participate in subunit-subunit interactions in the tetrameric channel complex. **B:** Two of the four subunits forming the tetrameric ROMK channel are depicted. The nucleotide-binding domain on the channel C-terminus is shown.

TRANSPORT DE POTASSIUM

LOCALISATION DES CANAUX ROMK

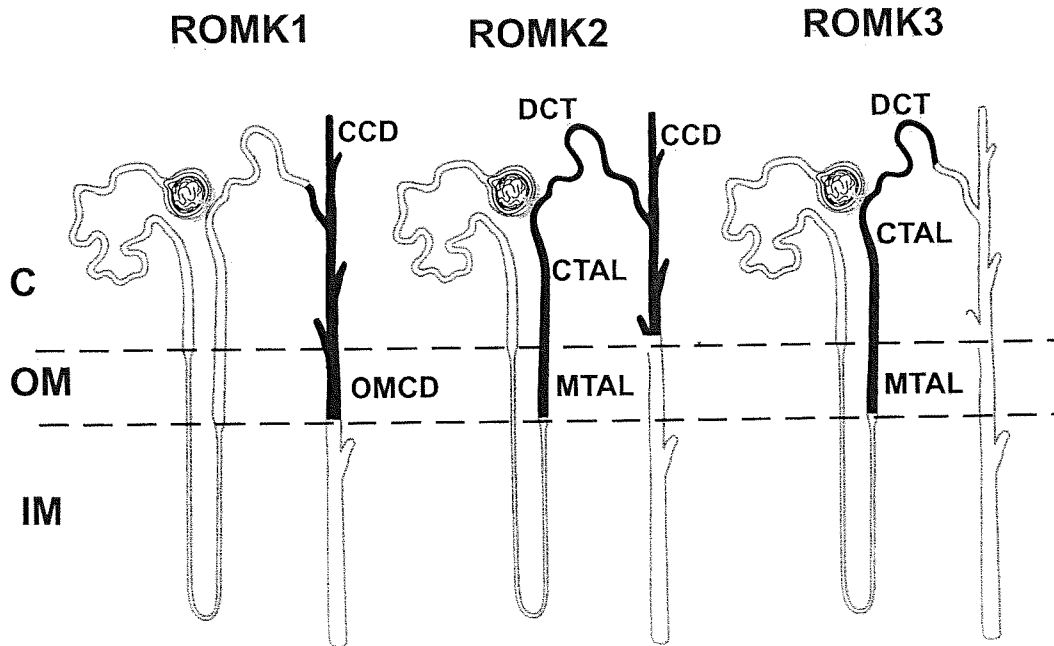
3 isoformes



N-terminal differences in ROMK isoforms

ROMK1	*	MGASERSVFRVLIRAL	TERMFKH
ROMK2,6			MFKH
ROMK3		MVSELSIPSPTVGAGLSKIRAL	TERMFKH

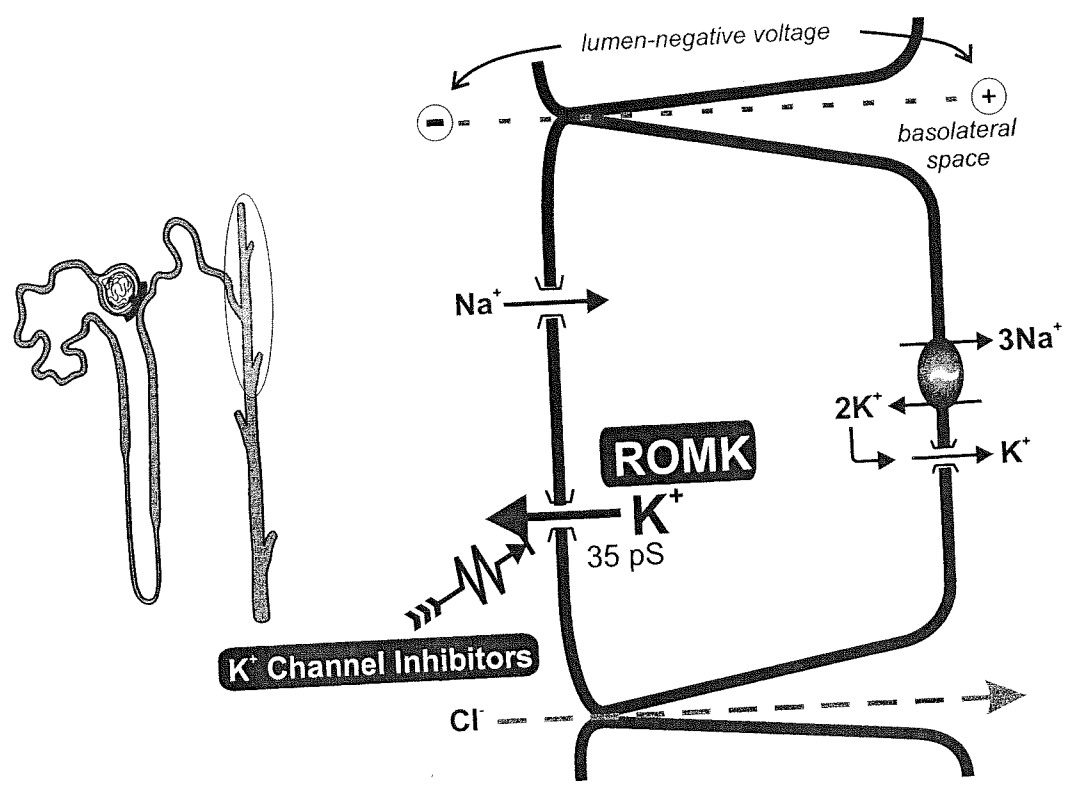
The ROMK splice variants. Current-voltage relationships for ROMK1, 2, and 3 are shown. Each of these variants has a similar I-V curve and calculated single channel conductance of 35 pS. The open probability of these three channels is also similar and greater than 0.9. ROMK1, ROMK2, ROMK3, and ROMK6 N-terminal amino acid sequences are shown using the single letter notation for residues. ROMK2 and ROMK6 have an identical amino acid sequence. ROMK1 and ROMK3 have 19 and 26 additional N-terminal amino acids, respectively, compared to ROMK2 or ROMK6. The asterisk in the ROMK1 sequence indicated a functional protein kinase C phosphorylation site.



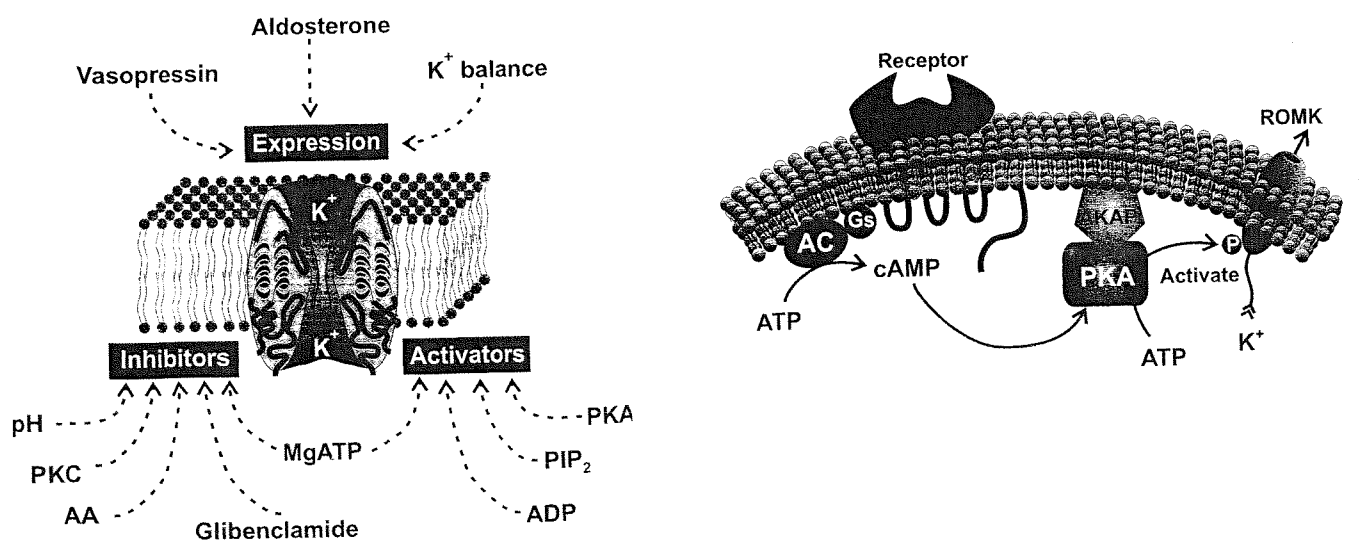
The distribution of the ROMK1, ROMK2, and ROMK3 isoforms along the rat nephron. The shaded regions indicate the localization of ROMK transcripts and protein. CCD, cortical collecting duct; CTAL, cortical thick ascending limb; DCT, distal convoluted tubule; MTAL, medullary thick ascending limb; OMCD, outer medullary collecting duct. In the CCD and OMCD, ROMK is expressed only in principal cells.

TRANSPORT DE POTASSIUM

MODELE DE TRANSPORT IONIQUE DANS LA CELLULE PRINCIPALE DU CCT



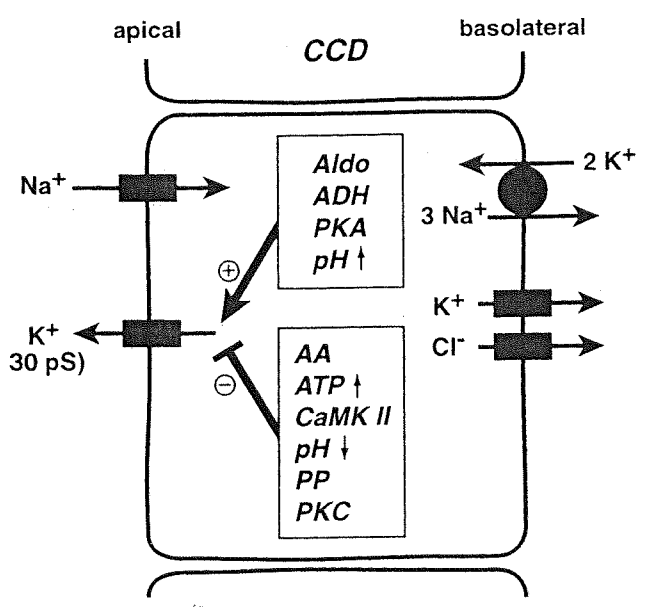
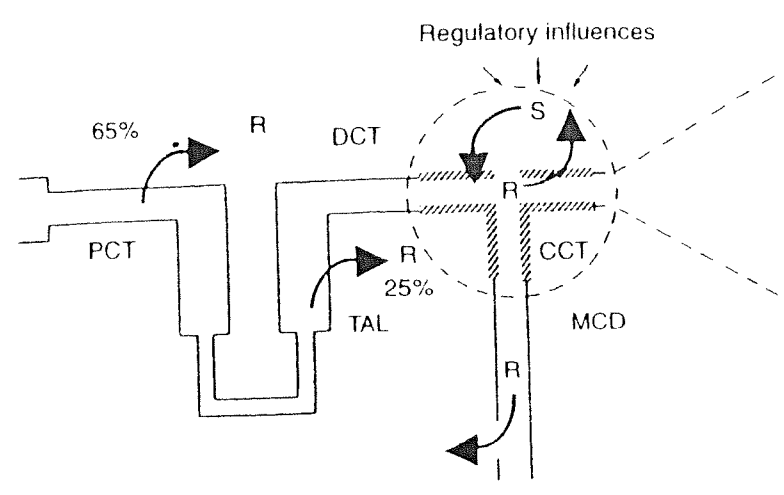
REGULATION DE ROMK



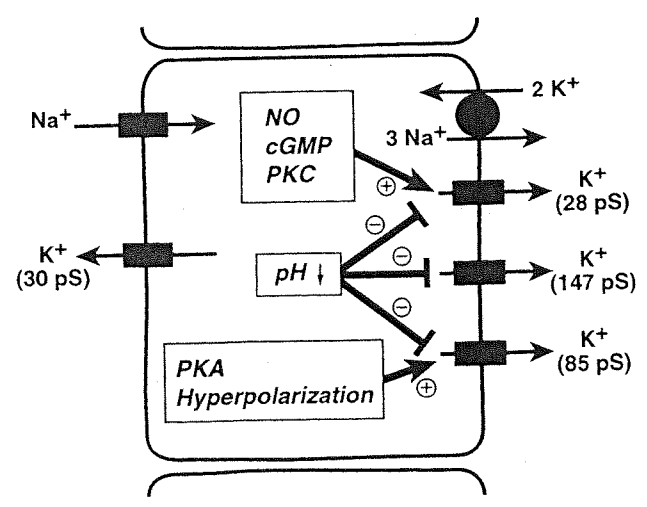
TRANSPORT DE POTASSIUM

REGULATION

Schémas



Regulation of apical secretory K^+ channel in principal cells of the cortical collecting duct



Regulation of basolateral K^+ channel in principal cells of the cortical collecting tubule

TRANSPORT DE POTASSIUM

REGULATION

Régime haut en K⁺

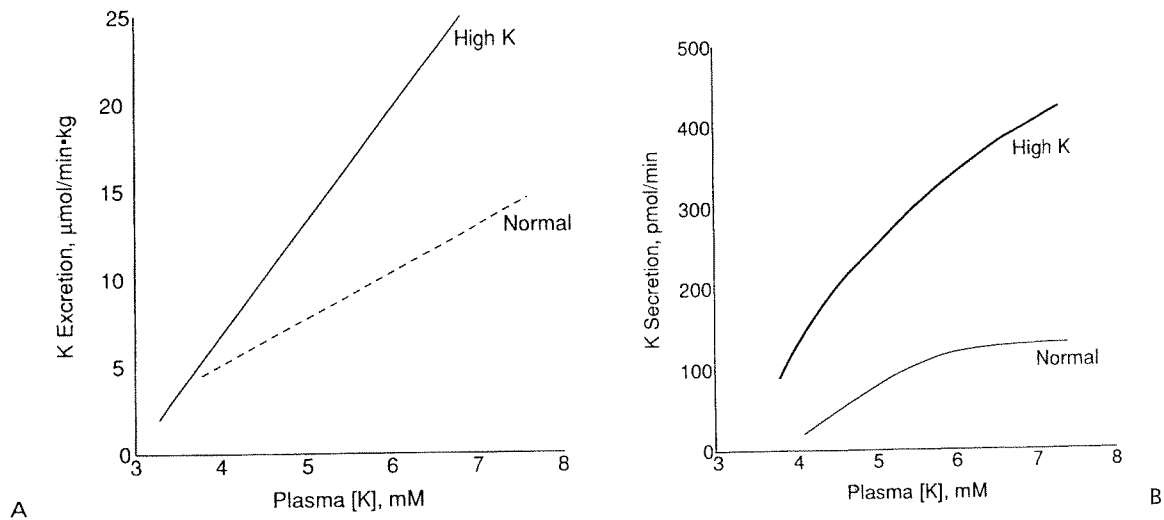
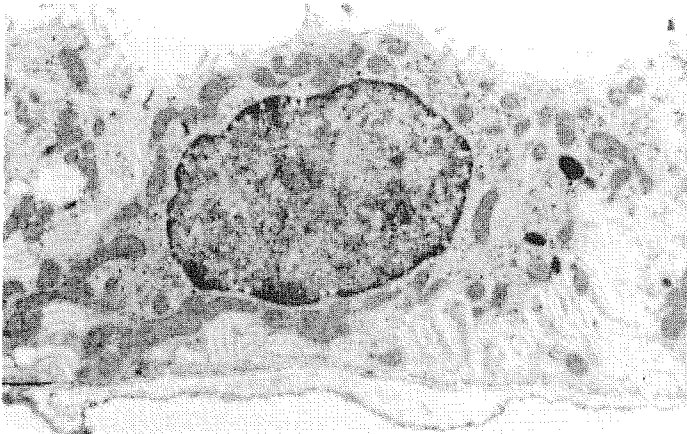


FIGURE 58-19. The relation between plasma K concentration and renal K excretion (365) (A), and distal K secretion (366) (B) is affected by dietary K intake: normal-K diet; high-K diet.



A



B

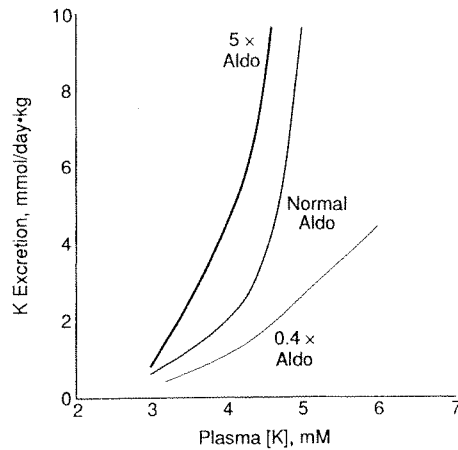
Il y a une augmentation de la sécrétion de potassium. La membrane basolatérale prolifère. Il y a une corrélation avec l'augmentation d'aldostérone due à l'hyperkaliémie mais l'hyperkaliémie aurait un effet indépendant de l'aldostérone

Transmission electron micrographs of principal cells. **A:** Cells from rat fed a normal-K diet. **B:** Cell from rat fed a high-K diet for 4 weeks (363).

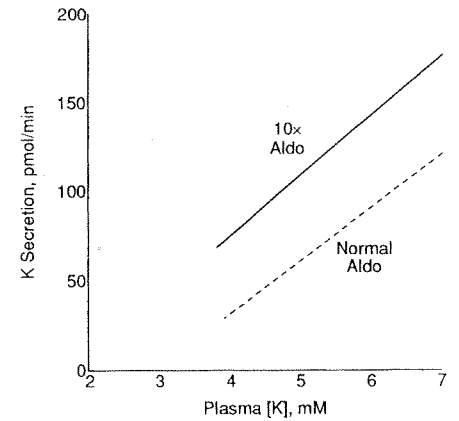
TRANSPORT DE POTASSIUM

REGULATION

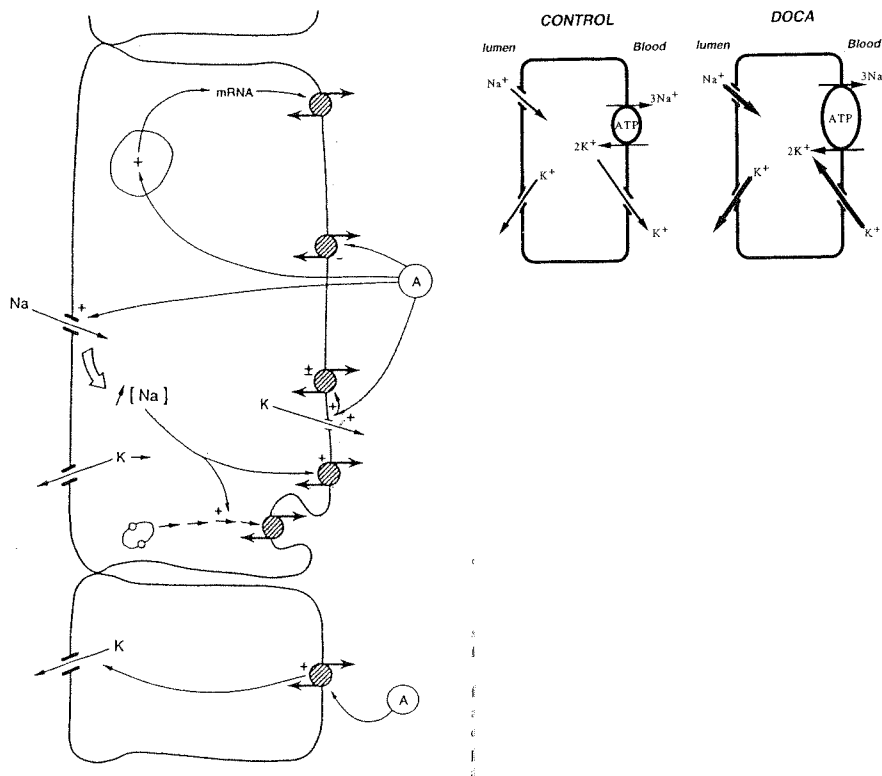
Aldostérone



A



B



L'aldostérone augmente la réabsorption de Na⁺ et stimule la sécrétion de K⁺. Son action se fait tout d'abord par une liaison avec des récepteurs cytoplasmiques pour former un complexe hormone-récepteur qui va activer la transcription et la synthèse de protéines spécifiques. Il y aura ensuite une action sur les transporteurs apicaux et basolatéraux selon deux phases :

Phase précoce: Il y a augmentation de la conductance de la membrane apicale au Na⁺. L'augmentation de Na⁺ cellulaire qui en découle active la NaK ATPase basolatérale ce qui augmente la sécrétion de K⁺.

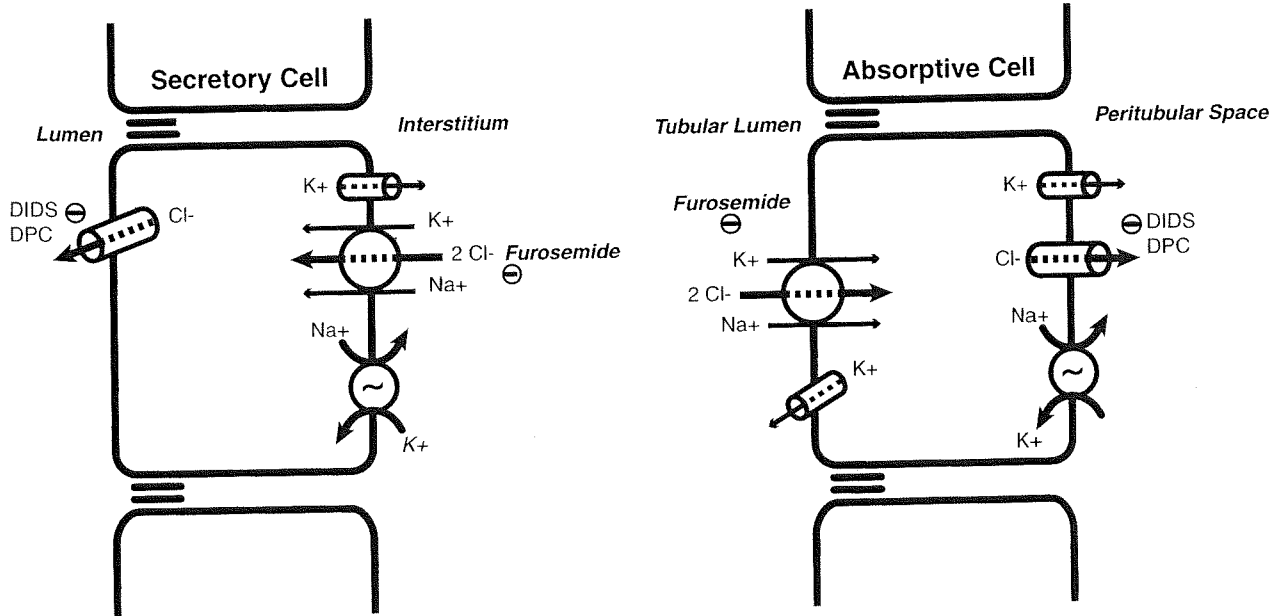
Phase tardive: Il y a une augmentation supplémentaire des transports de Na et K⁺ et une insertion de nouvelles unités de NaK ATPase dans la membrane.

**PHYSIOLOGIE DES CELLULES DISTALES ET
DU CANAL COLLECTEUR**

Transport de Cl⁻

TRANSPORT DE CHLORURES

SECRETION VS REABSORPTION



LES CANAUX PERMEABLES AUX Cl⁻

Généralités:

ELECTROPHYSIOLOGIC PROPERTIES OF Cl⁻ CHANNELS FOUND IN KIDNEY

Channel	Molecular weight (kd)	Conductance	I-V rectifying	Anion selectivity	Inhibitors DIDS/DPC	Regulation
ClC-2	99 kd	3-5 ps	Inward	Cl ≥ Br > I	- +/-	Osmotic swelling, hyperpolarization
ClC-3	84	140 ps-s1	Outward	I > Cl	+ -	pH, Ca ²⁺ , ATP, PKC, current
ClC-5	83	100 ps-s2	Outward	Cl > Br > I	+	Hyperpolarization, depolarization, pH, Ca ²⁺ , furosemide
ClC-K1	75	40 ps-s3	Outward	Br > Cl > I	+	
ClC-K2	75	5-8ps	Outward	Br > I > Cl	+ +/-	cAMP, PKA, PKC
CFTR	160		Linear	Br ≥ Cl > I	- +	
ICln	26		Outward	SCN > I > Br > Cl	+	
Maxi anion		200-400ps	Linear	Ac = HCO ₃ > Cl	++	Voltage, swelling

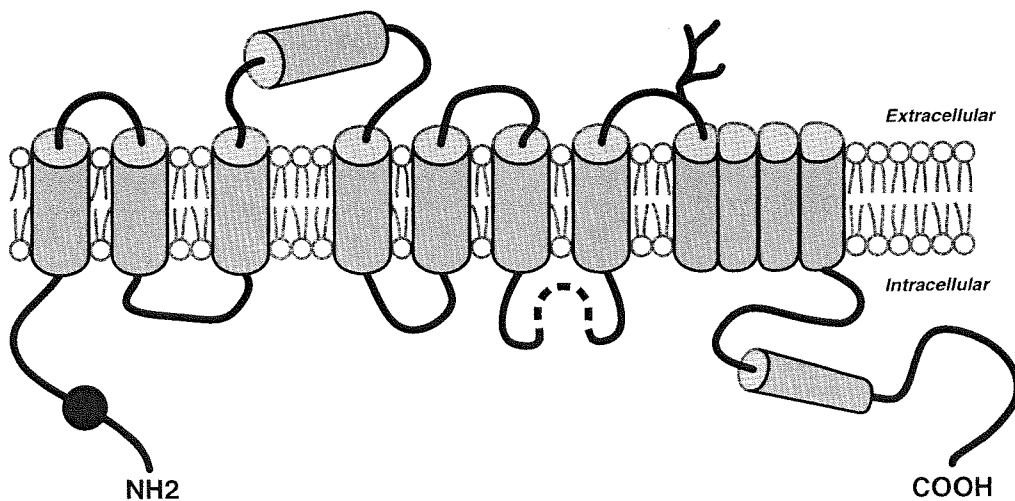
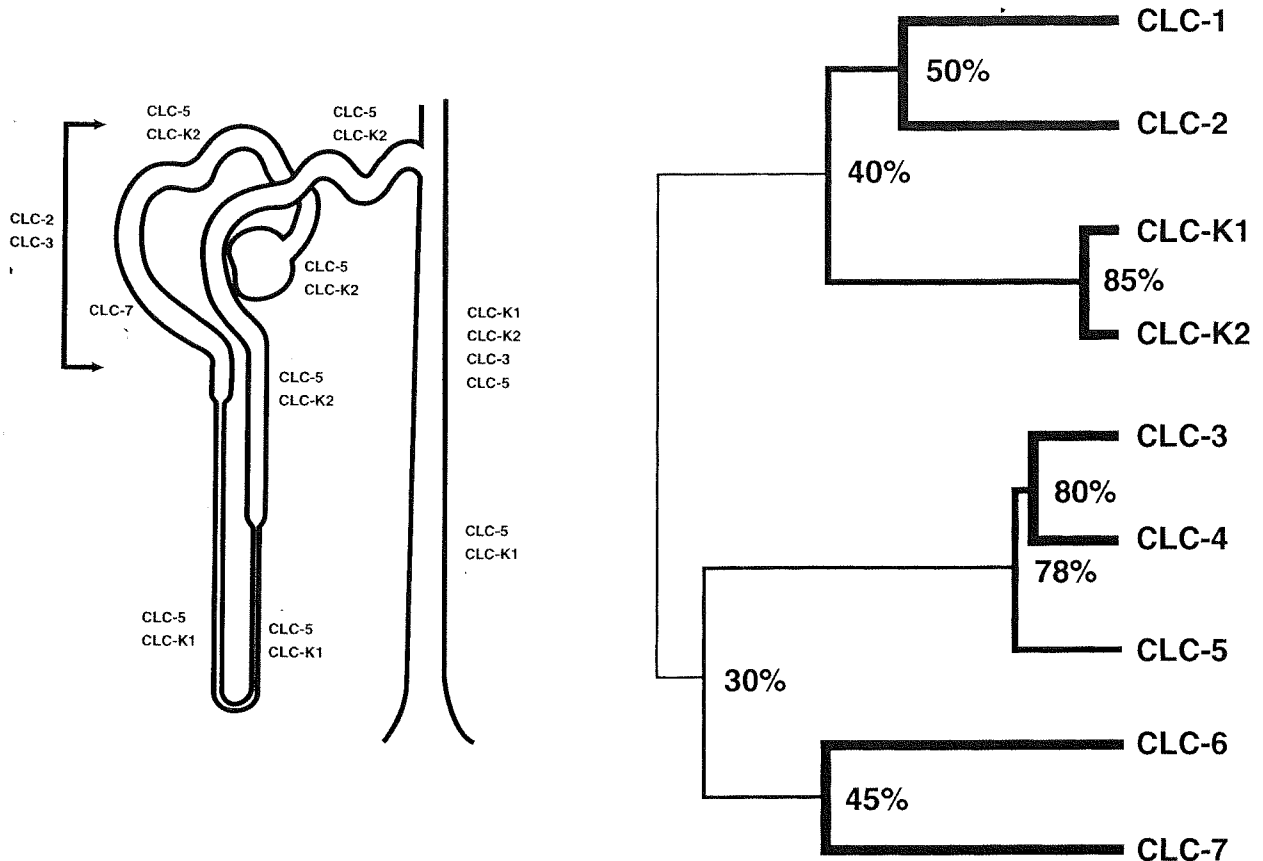
Ac, acetate; ATP, adenosine triphosphate; cAMP, 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate; I, current; V, voltage; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; SCN, thiocyanate.

TRANSPORT DE CHLORURES

LES CANAUX PERMEABLES AUX Cl⁻

La famille des ClC:

Le premier membre est ClC-0, il a été isolé de l'organe électrique de la raie torpille.

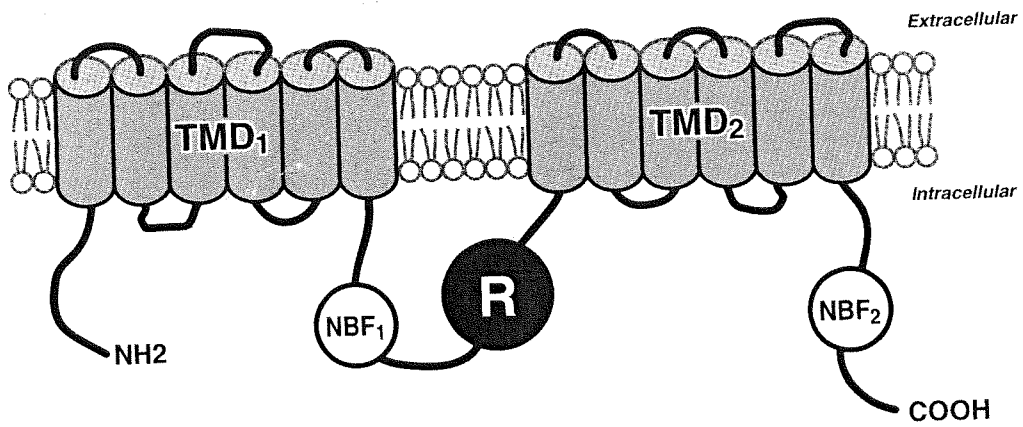
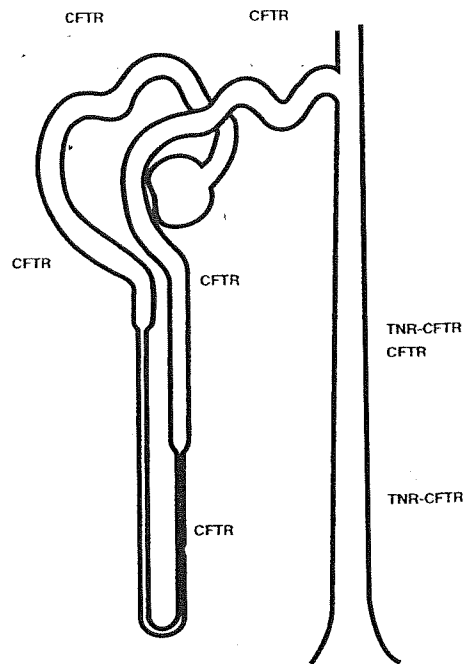


Putative topology of ClC channels. ClC channels have 13 hydrophobic domains (D). D4 and D13 do not span the membrane. There is an amino terminal inactivation domain (ball) and a putative receptor for this inactivation domain in the intracellular loop between D7 and D8 (43). The function of the C-terminal domain has not been determined, but this is generally the most variable region among ClC family members.

TRANSPORT DE CHLORURES

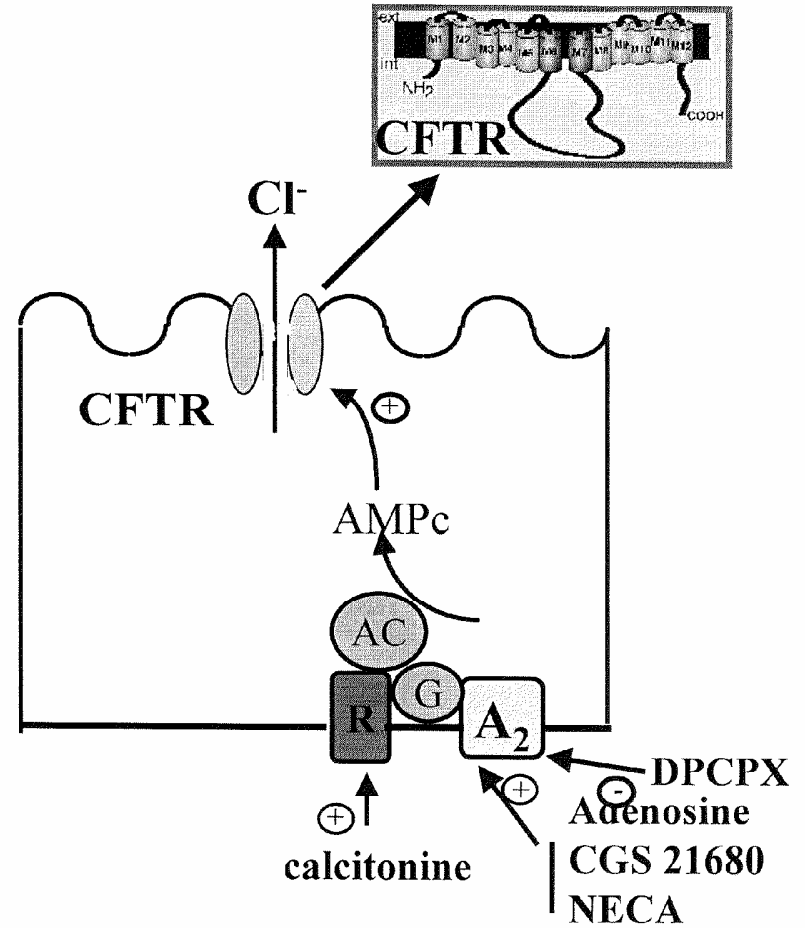
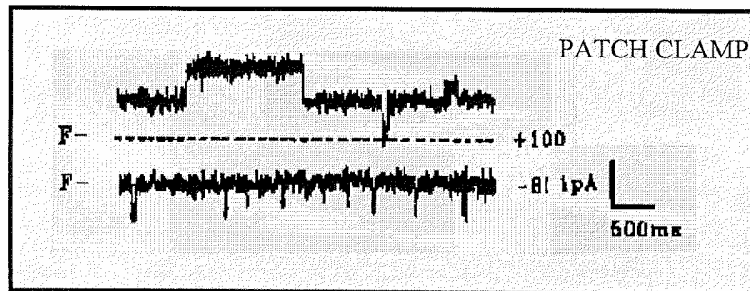
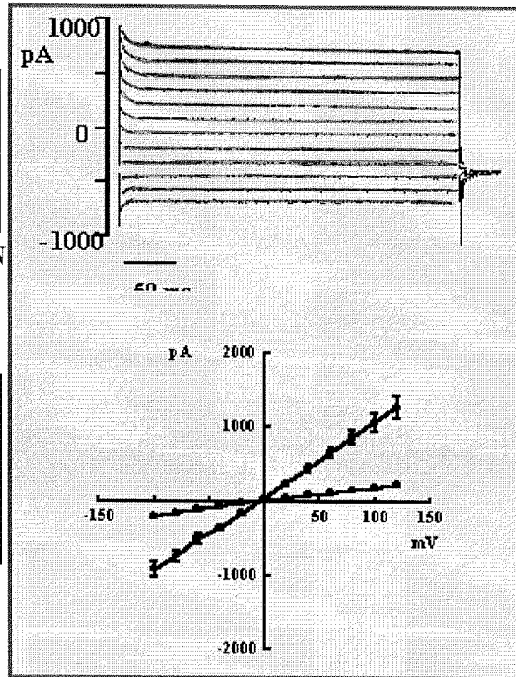
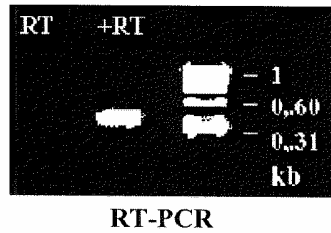
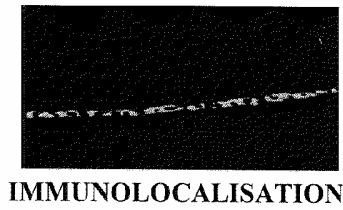
LES CANAUX PERMEABLES AUX Cl⁻

CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator)
C'est la protéine impliquée dans la mucoviscidose.

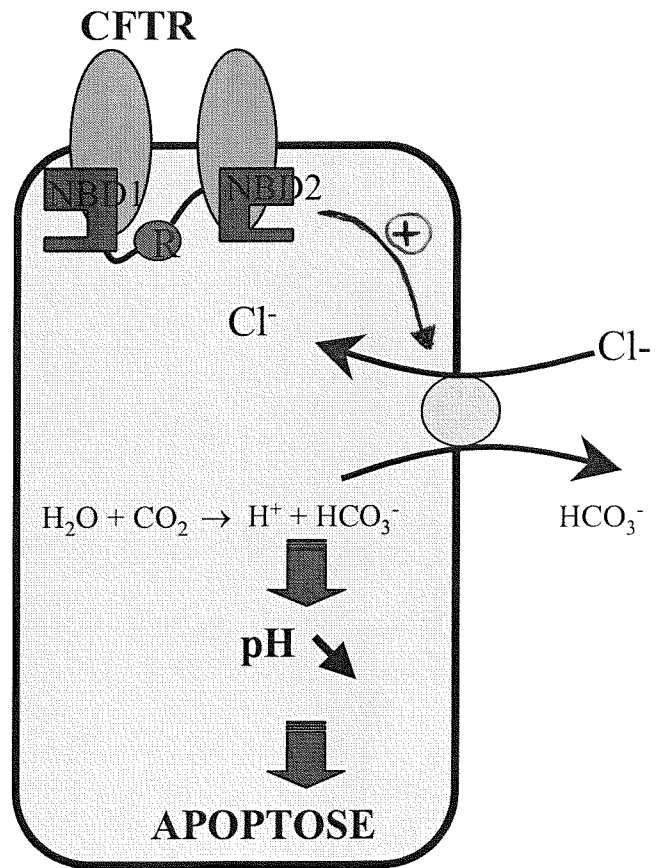
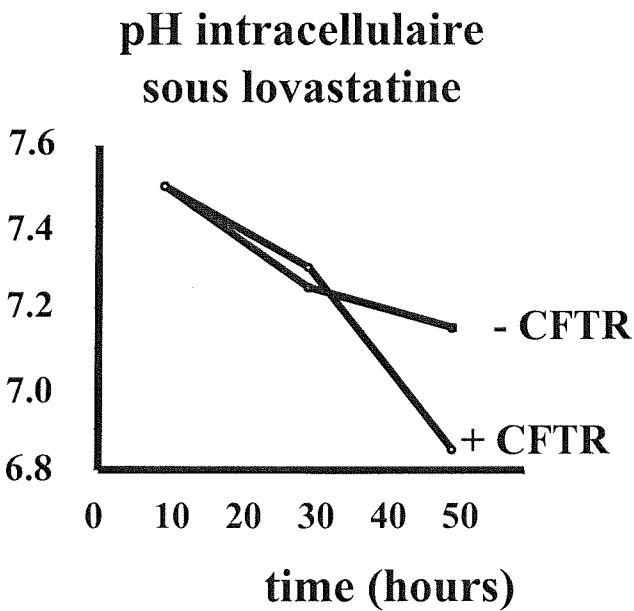
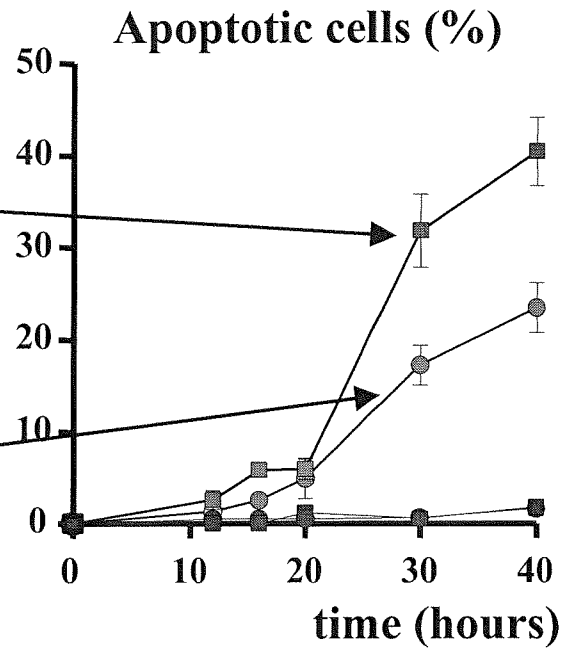
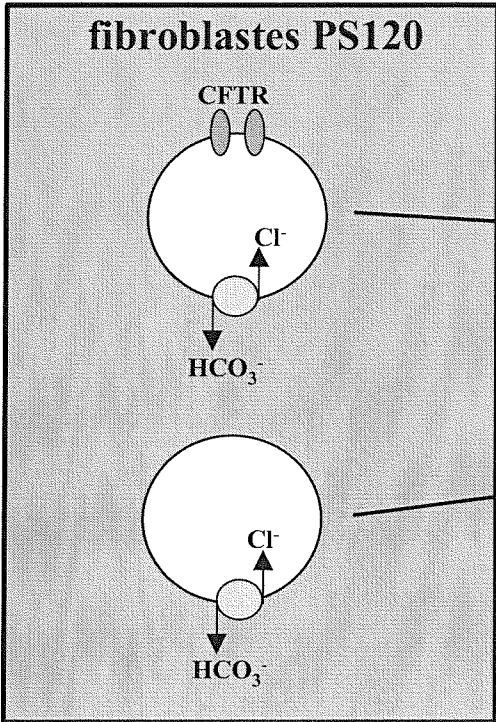


Topology of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). The CFTR Cl⁻ channel has 12 putative transmembrane domains, two nucleotide binding domains (NBF), and a regulatory region (R) that contains several potential phosphorylation sites by PKA and PKC.

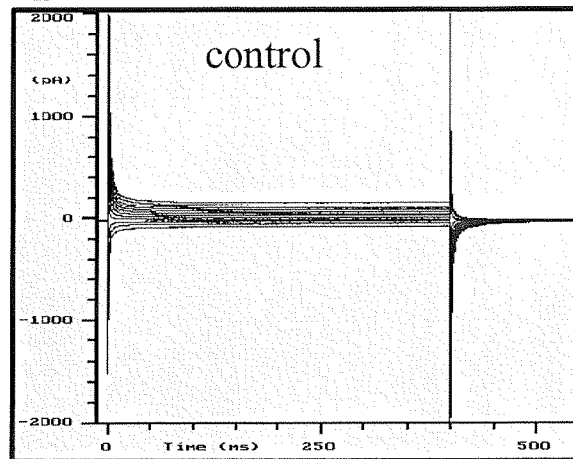
Conductance Cl⁻ CFTR



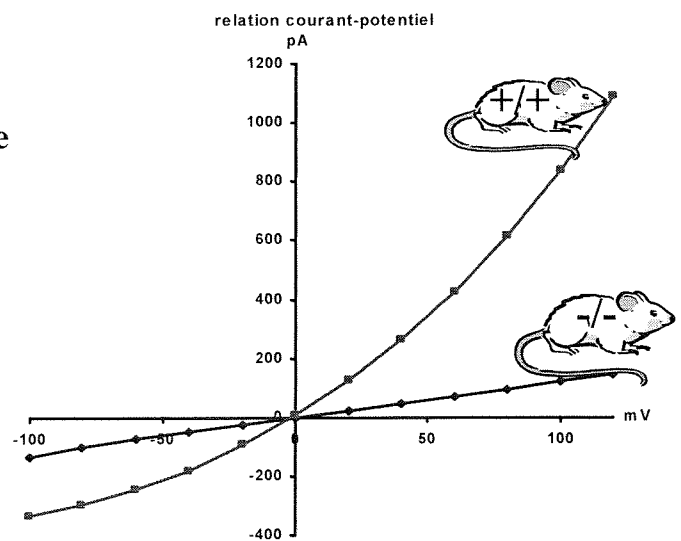
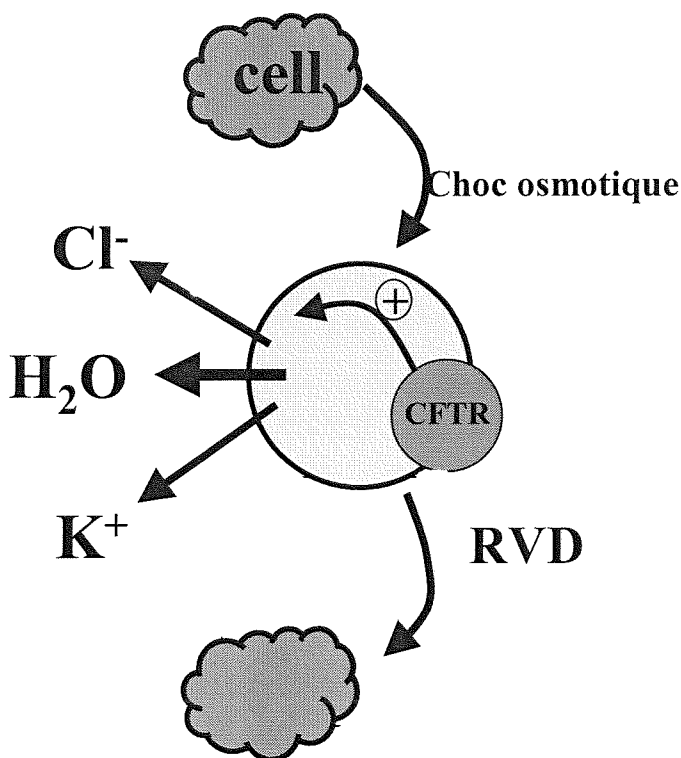
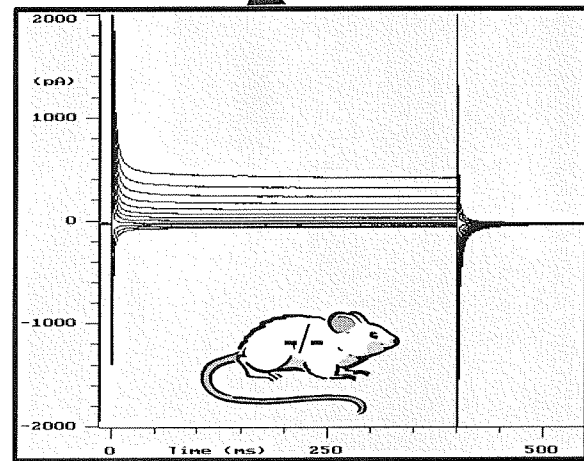
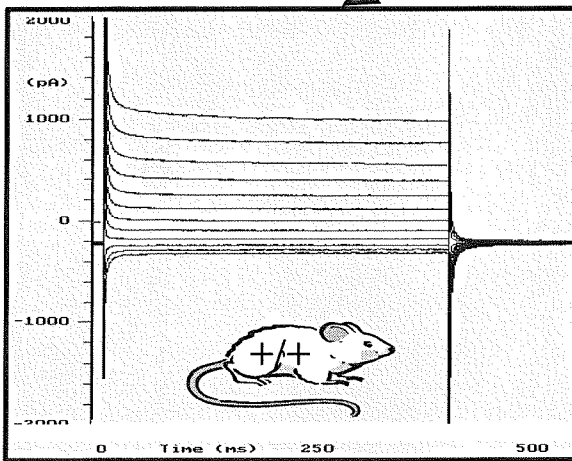
Rôle de la protéine CFTR dans l'apoptose induite par la lovastatine



Contrôle par CFTR du canal Cl⁻ activé par un choc osmotique



Choc osmotique



TRANSPORT DE CHLORURES

LES CANAUX PERMEABLES AUX Cl⁻

Résumé

	activateurs	I/V	inhibiteurs	sélectivité ionique	profil électrophysiologique
CFTR ou CFTR "like"	g Cl ⁻ AMPc	AMPc PKA, ATP PKC	DPC NPPB glibenclamide I ⁻	Br ⁻ > Cl ⁻ > I ⁻	
Famille des ClC?	g Cl ⁻ ORCC	AMPc PKA, ATP PKC	DIDS DPC NPPB	I ⁻ > Br ⁻ > Cl ⁻	
	g Cl ⁻ volume	choc osmotique	DIDS DPC NPPB	I ⁻ > Br ⁻ > Cl ⁻	
	g Cl ⁻ Ca ²⁺	calcium	DIDS DPC NPPB	I ⁻ > Br ⁻ > Cl ⁻	

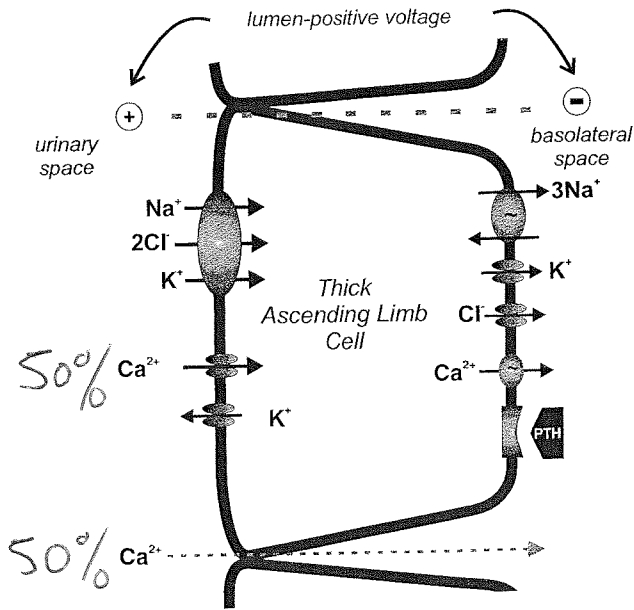
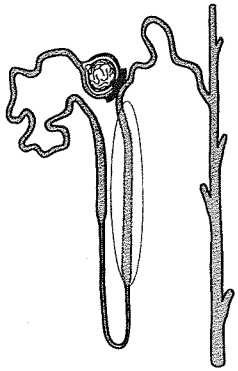
Propriétés des différents courants chlorures macroscopiques des épithéliums

**PHYSIOLOGIE DES CELLULES DISTALES ET
DU CANAL COLLECTEUR**

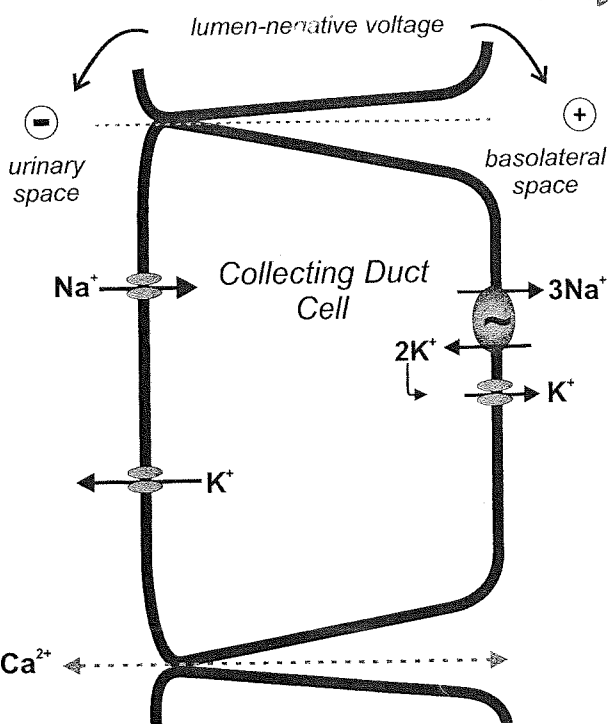
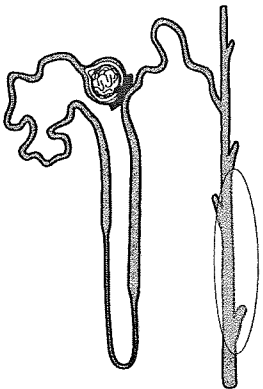
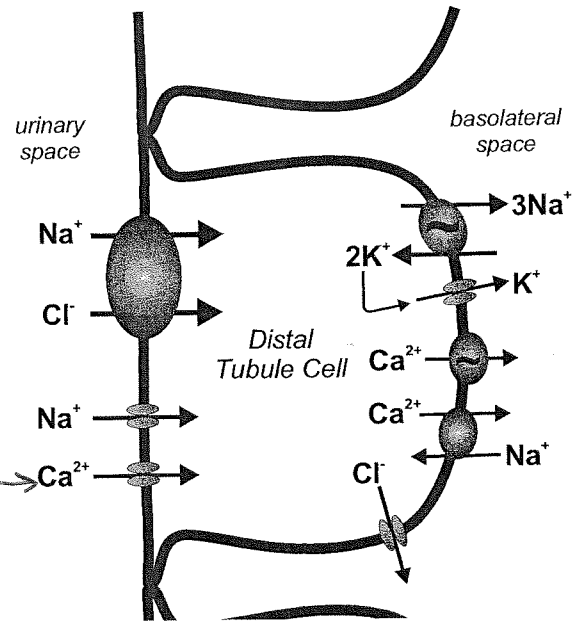
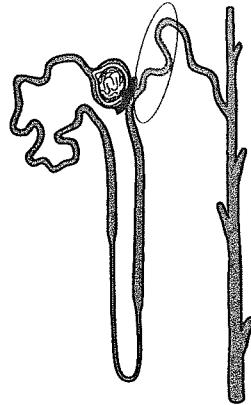
Transport de Ca²⁺

TRANSPORT DE CALCIUM

Réabsorption de calcium le long du néphron



DISTAL →

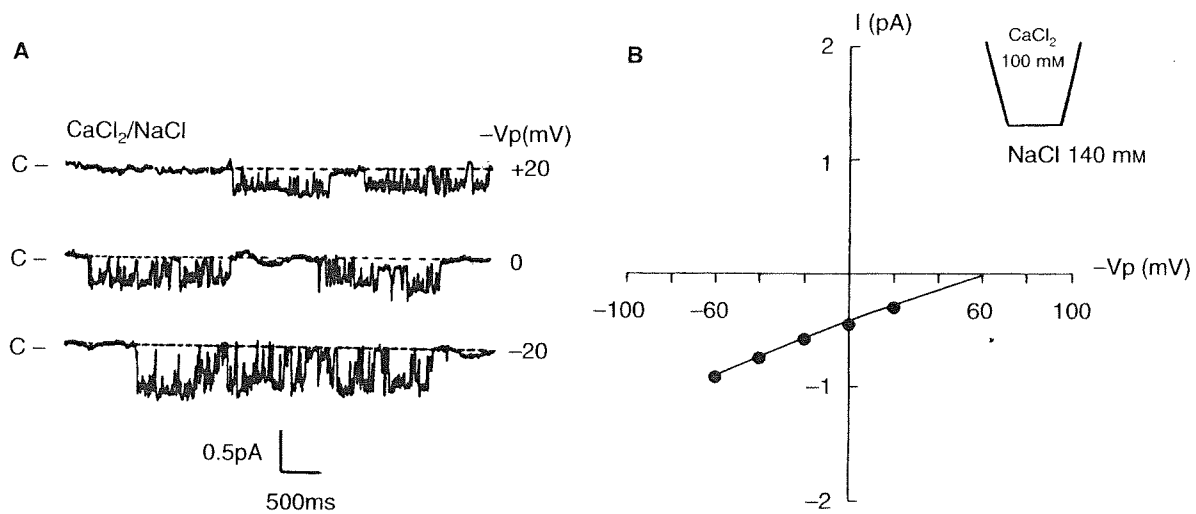


TRANSPORT DE CALCIUM

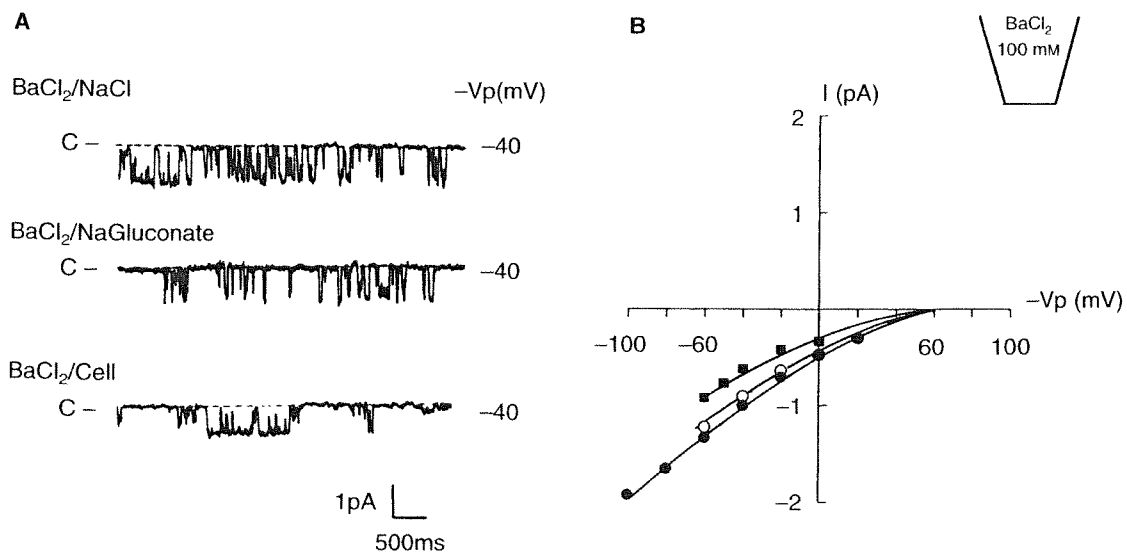
CANAL CALCIUM DANS LE TUBULE DISTAL

Mise en évidence d'un canal apical

*Patch clamp sur cultures primaires de cellules du distal de lapin



Calcium channels in the apical membrane of cultured DCTb cells recorded from excised inside-out patches (A), with corresponding current-voltage (I/V) relationship (B). Vp indicates the pipette voltage and C the closed state of the channel.



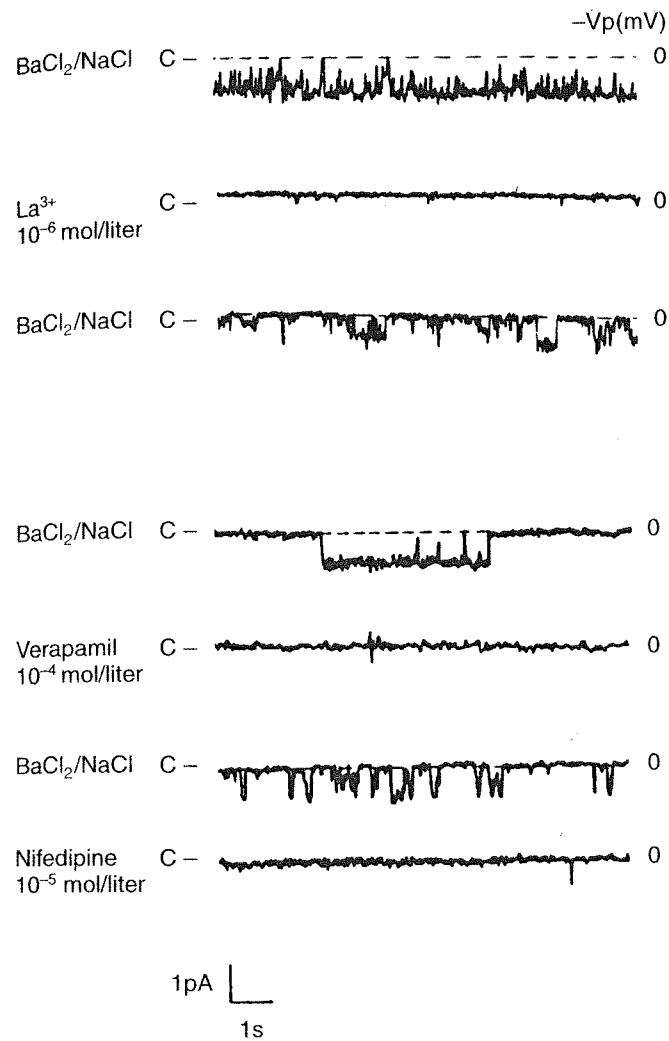
Calcium channels in the apical membrane of cultured DCTb cells recorded from cell-attached patches (■) and from excised inside-out patches (○), with corresponding current-voltage (I/V) relationships (B). Vp indicates the pipette voltage and C the closed state of the channel.

TRANSPORT DE CALCIUM

CANAL CALCIUM DANS LE TUBULE DISTAL

Mise en évidence d'un canal apical

*Patch clamp sur cultures primaires de cellules du distal de lapin



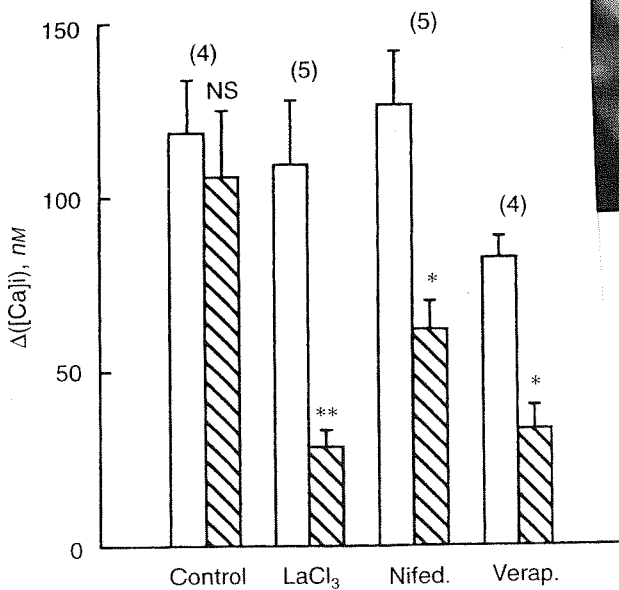
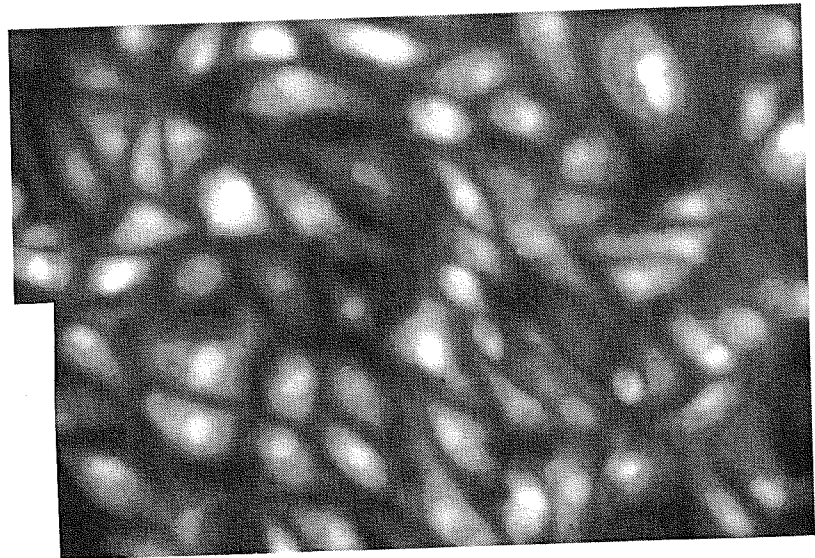
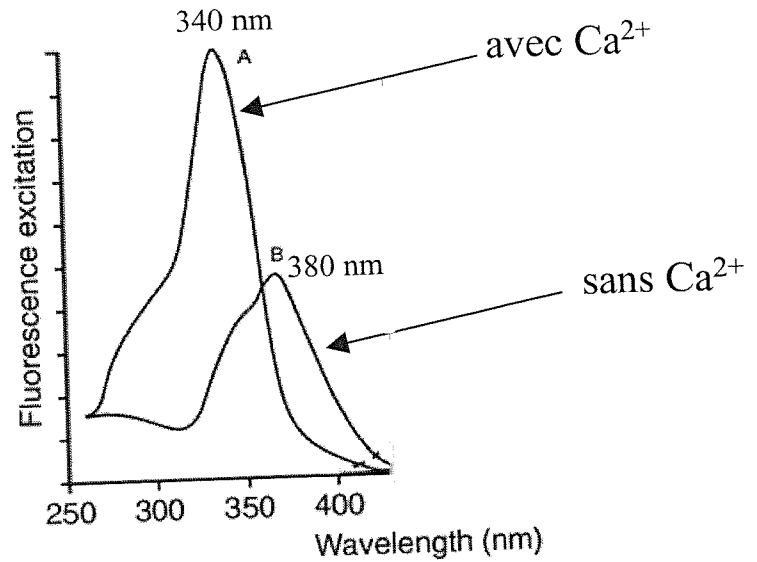
Pharmacological properties of the calcium channel. The channel was recorded in the excised inside-out configuration at $V_p = 0$ mV. The pipette contained 100 mM $BaCl_2$ and the bath 140 mM $NaCl$. C indicates the closed state of the channel. The perfusion on the cytoplasmic face of $1 \mu M$ $LaCl_3$, 0.1 mM verapamil or $10 \mu M$ nifedipine strongly inhibited the channel activity.

TRANSPORT DE CALCIUM

CANAL CALCIUM DANS LE TUBULE DISTAL

Mise en évidence d'une perméabilité apicale

*Mesure du calcium intracellulaire avec le Fura-2

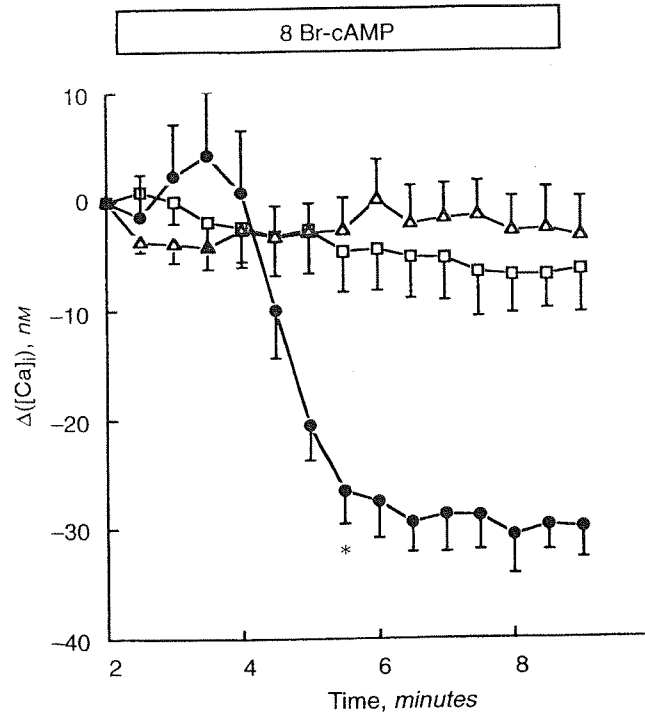


Cytoplasmic calcium variations ($\Delta[Ca]_i$) induced by extracellular calcium pulses on the apical face of cultured DCTb cells. Cytoplasmic calcium concentration was measured by fluorescent video microscopy with $2 \mu\text{M}$ Fura2 AM as calcium probe. Apical calcium pulses from 0.1 to 1 mM induced a cytoplasmic calcium increases (\square) which were inhibited by $10 \mu\text{M}$ lanthanum ($P < 0.01$), $20 \mu\text{M}$ nifedipine ($P < 0.05$) and $20 \mu\text{M}$ verapamil ($P < 0.05$) (\boxtimes ; Number of experiments are in brackets).

TRANSPORT DE CALCIUM

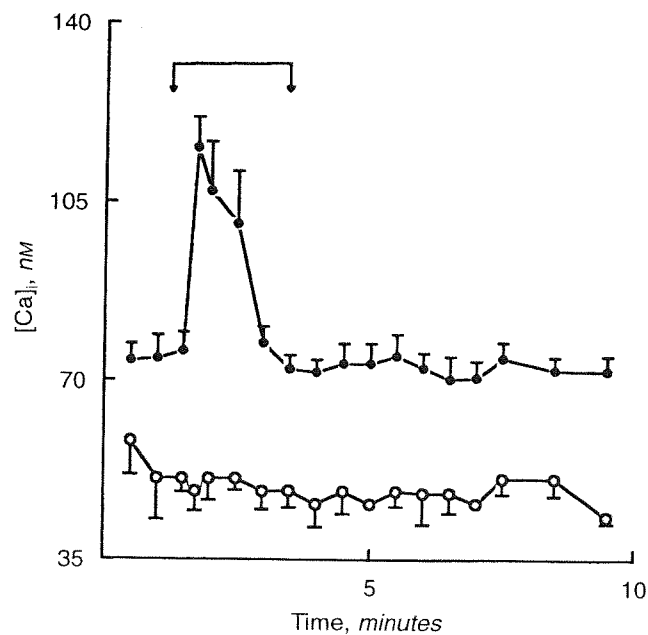
Régulation de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ basolatéral

AMPC



Effect of 8-bromo-cAMP on the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange activity. Symbols are: (●) control; (□) bepridil; (△) BI NMDGCl. The apical membrane was continuously perfused with nifedipine containing solution. An external basolateral calcium concentration decrease from 1 mM to 0.01 mM induced a decrease of the cytoplasmic calcium. This last value was zeroed to calculate subsequent cytoplasmic calcium variations ($\Delta [\text{Ca}]_i$) induced by 10^{-4} M 8-bromo-cAMP. NMDG and bepridil solutions were perfused in the basolateral compartment only. (*) Value significantly different from that determined at $t = 0$ minutes, $P < 0.05$ ($N = 4$).

Calcitonine



Effect of (●) human calcitonin (HCT) and (○) 8-bromo-cAMP on resting cytoplasmic calcium concentrations in cultured DCTb cells ($N = 5$).

TRANSPORT DE CALCIUM

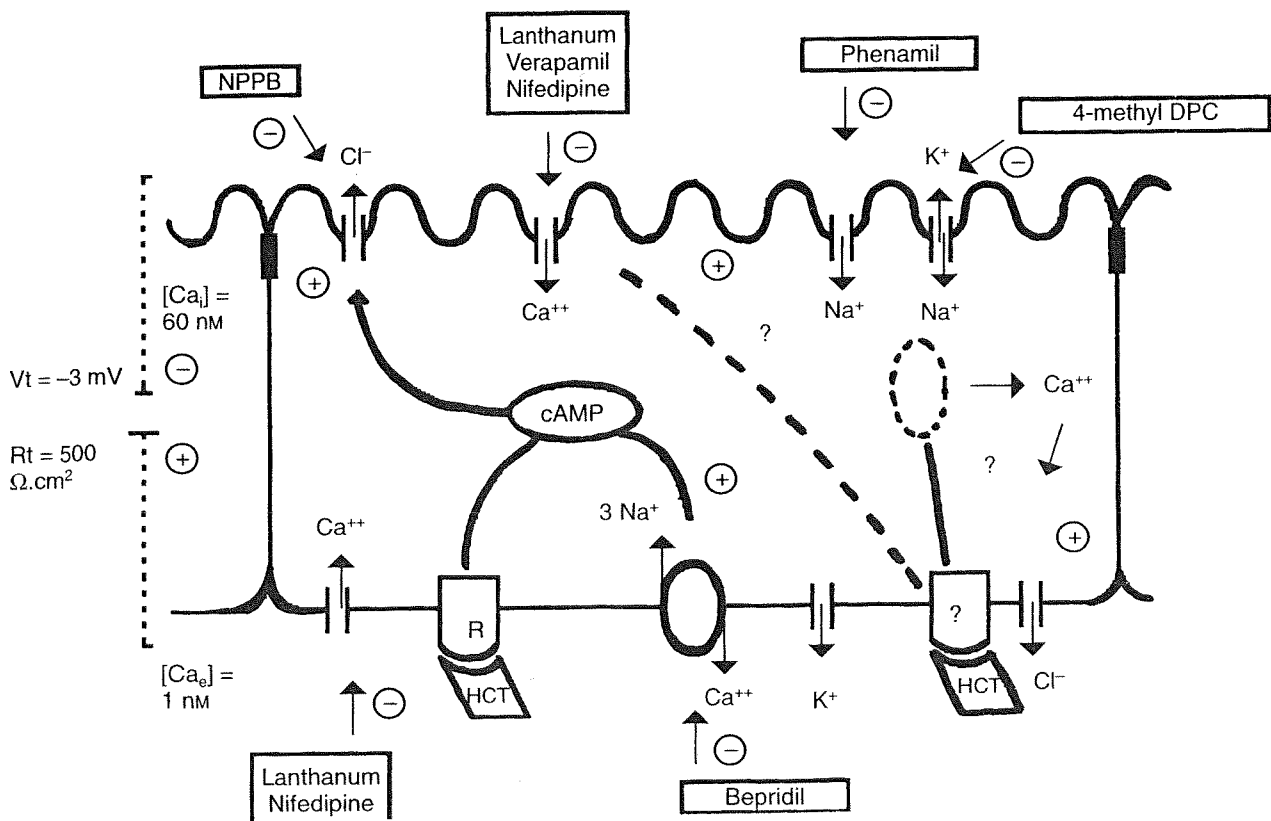
RÉGULATION DE LA RÉABSORPTION DE Ca^{++} DANS LE TUBULE DISTAL

Récepteurs à la calcitonine et à la PTH

STIMULATION OF ADENYLYL CYCLASE BY PTH AND CALCITONIN IN DISTAL NEPHRON SEGMENTS

Hormone	Nephron segment	Mouse	Rabbit	Rat	Human
PTH	PCT	++++	++++	++	++
	PST	++	++	+	++
	MTAL	0	0	ND	++
	CTAL	++++	++	++++	++
	DCT	++++	0	++++	++++
	CNT	0	+++	++	+
	CCD	0	0	+	0
	MCD	0	0	0	ND
Calcitonin	PCT	+	+	0	+
	PST	0	0	0	+
	MTAL	0	+++	++	++
	CTAL	+	+	++++	+++
	DCT	+++	++++	++++	++++
	CNT	++	0	+	0
	CCD	+	0	+++	(+)
	MCD	0	0	0	(+)
					(?)

Rôle de la calcitonine (cas du lapin): Effet sur l'échangeur Na^+/Ca^{++}



Rôle de la PTH (rat, souris et homme) Effet sur le canal calcium apical par hyperpolarisation de la membrane et mise en place de canaux calcium.

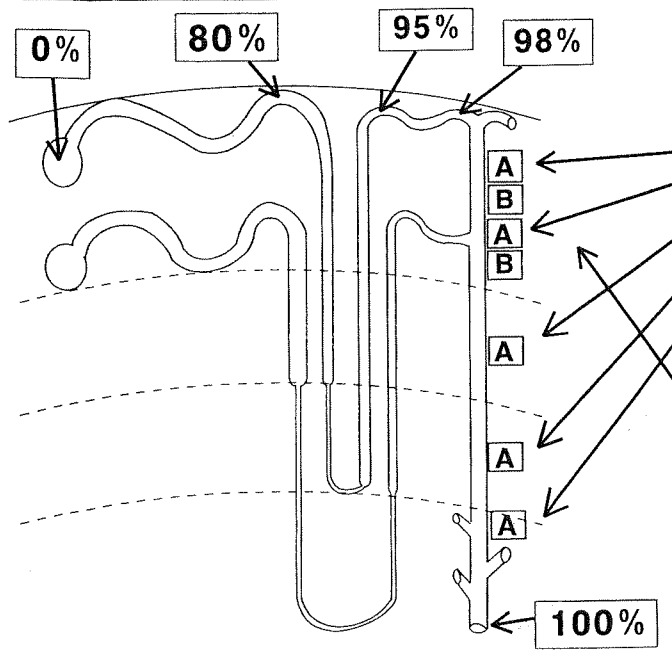
**PHYSIOLOGIE DES CELLULES DISTALES ET
DU CANAL COLLECTEUR**

Régulation du pH

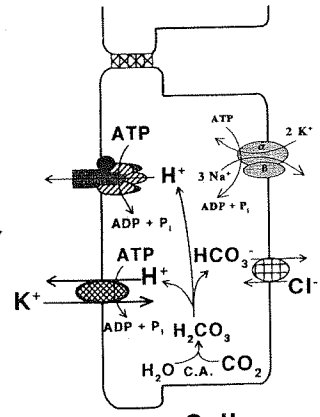
REGULATION DU pH

CAS DES CELLULES INTERCALAIRES

H⁺ and HCO₃⁻ Transport in the Intercalated Cells of the Collecting Duct

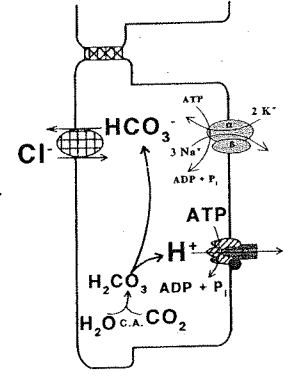


Lumen Cell Capillary



Type A

Lumen Cell Capillary



Type B

Pattern of bicarbonate reabsorption along the nephron and transport mechanisms in the collecting duct. The percentage of the filtered bicarbonate reabsorbed by the end of the accessible proximal tubule, by the early and late distal tubule, and by the end of the papillary collecting duct under normal conditions is shown in the boxes. No H⁺ secretion occurs in the thin limbs of Henle's loop. H⁺ secretion in the distal tubule occurs primarily by the Na⁺/H⁺ exchanger, although some H⁺-ATPase may also be present. In the collecting tubule, H⁺ secretion is confined to a subpopulation of cells called intercalated cells. In the cortical collecting tubule, two types of intercalated cells (A-type and B-type) are present. Type A cells secrete H⁺, primarily by means of an H⁺-ATPase, but also by H⁺/K⁺-ATPase. Type B cells, by contrast, secrete HCO₃⁻ ions by a Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger. In the outer medullary collecting tubule, and in the first part of the inner medullary collecting tubule, only type A intercalated cells are present. H⁺ secretion occurs in the terminal collecting tubule, but the mechanism is not defined.

**PHYSIOLOGIE DES CELLULES DISTALES ET
DU CANAL COLLECTEUR**

Régulation du transport d'eau

REGULATION DU TRANSPORT D'EAU

Chez l'homme le filtrat glomérulaire est de 180 litres par jour. La majorité de ce filtrat est réabsorbée le long des tubules proximaux et des anses de Henle descendantes qui sont hautement perméables à l'eau. Les anses ascendantes sont imperméables à l'eau. Par contre les tubules collecteurs vont jouer un rôle essentiel dans la régulation fine de la balance hydrique. C'est dans ces segments que la perméabilité à l'eau est sous le contrôle de l'ADH (vasopressine).

Le modèle le plus utilisé pour l'étude de l'action de l'ADH a été la vessie urinaire des amphibiens qui est structurellement voisine du collecteur de mammifère. Sur cet épithélium il a été démontré que la vasopressine augmente la perméabilité hydrique de la membrane apicale et que cette augmentation correspondait à la redistribution de particules protéiques à la surface de la membrane, ces particules devant contenir des canaux hydriques.

LES AQUAPORINES

L'aquaporine 1 (AQP1) : découverte en premier à partir d'un groupe rhesus des hématies (CHIPS 28 pour channel-like protein of 28 kDa) nommée finalement AQP1 sur la base des ses propriété de perméabilité à l'eau.

On sait maintenant que AQP1 est un pore selectif à l'eau constitutivement actif

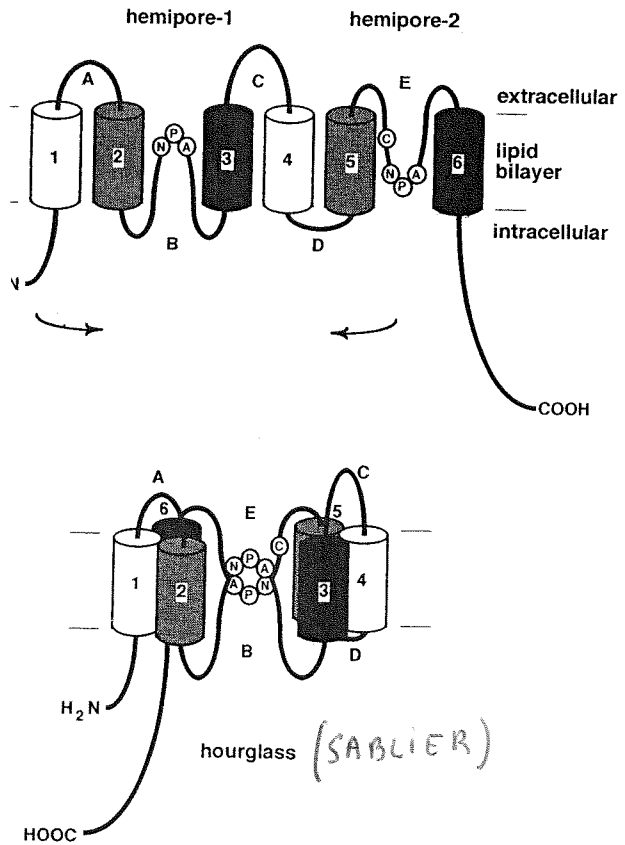
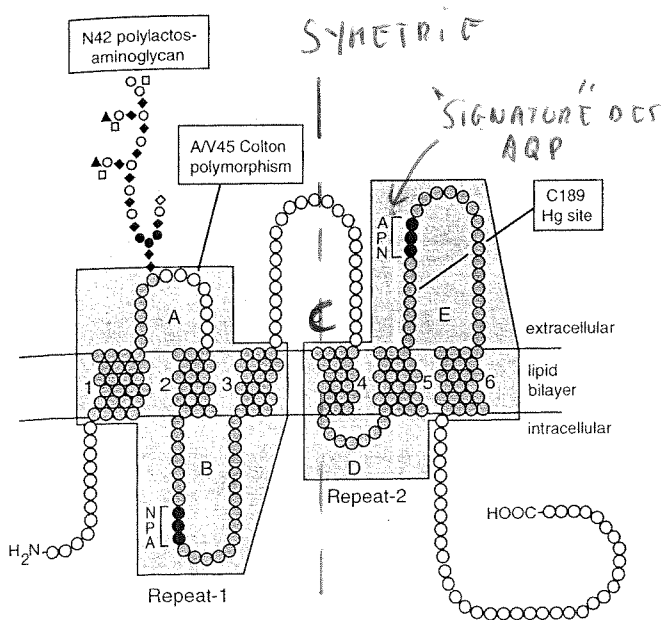


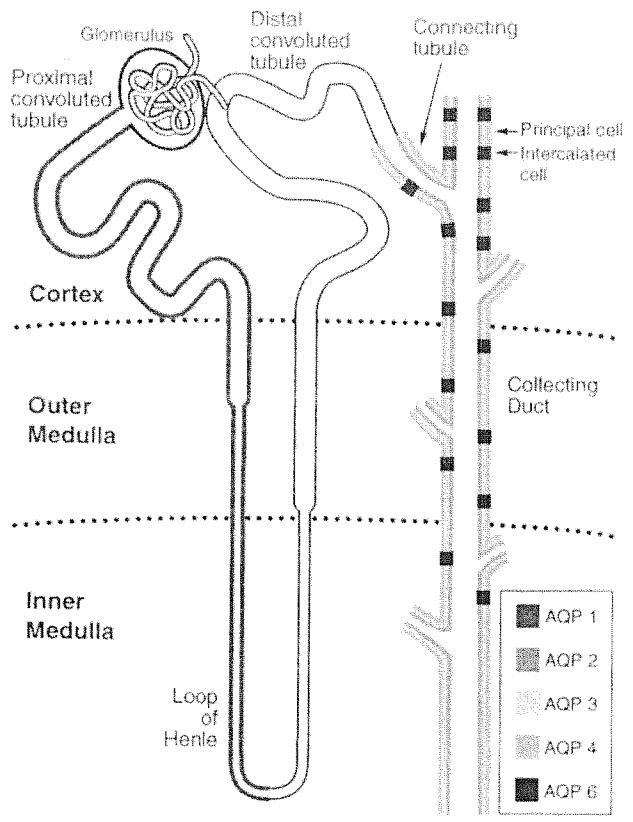
FIGURE 11-11

REGULATION DU TRANSPORT D'EAU

DISTRIBUTION DES AQUAPORINES

AQUAPORINS IN KIDNEY

AQP	Localization (renal)	Subcellular distribution	Regulation	Localization (extrarenal)
AQP1	S2, S3 segments of proximal tubules	Apical and basolateral plasma membranes	Unknown	Multiple tissues including capillary endothelia, choroid plexus, ciliary and lens epithelium, corneal endothelium
AQP2	Collecting duct principal cells	Intracellular vesicles, apical plasma membrane	Vasopressin stimulates short-term exocytosis, long-term biosynthesis	Testis
AQP3	Collecting duct principal cells	Basolateral plasma membrane	Vasopressin stimulates long-term biosynthesis	Multiple tissues including airway basal epithelia, conjunctiva, colon
AQP4	Collecting duct principal cells	Basolateral plasma membrane	Unknown	Multiple tissues including CNS astroglia, ependyma, airway surface epithelia
AQP6	Glomerular podocytes, S2, S3 prox. tubules, collecting duct intercalated cells	Intracellular vesicles	Rapidly gated	Unknown
AQP7	S3 proximal tubules	Apical plasma membrane	Unknown	Multiple tissues including testis, heart, and adipose

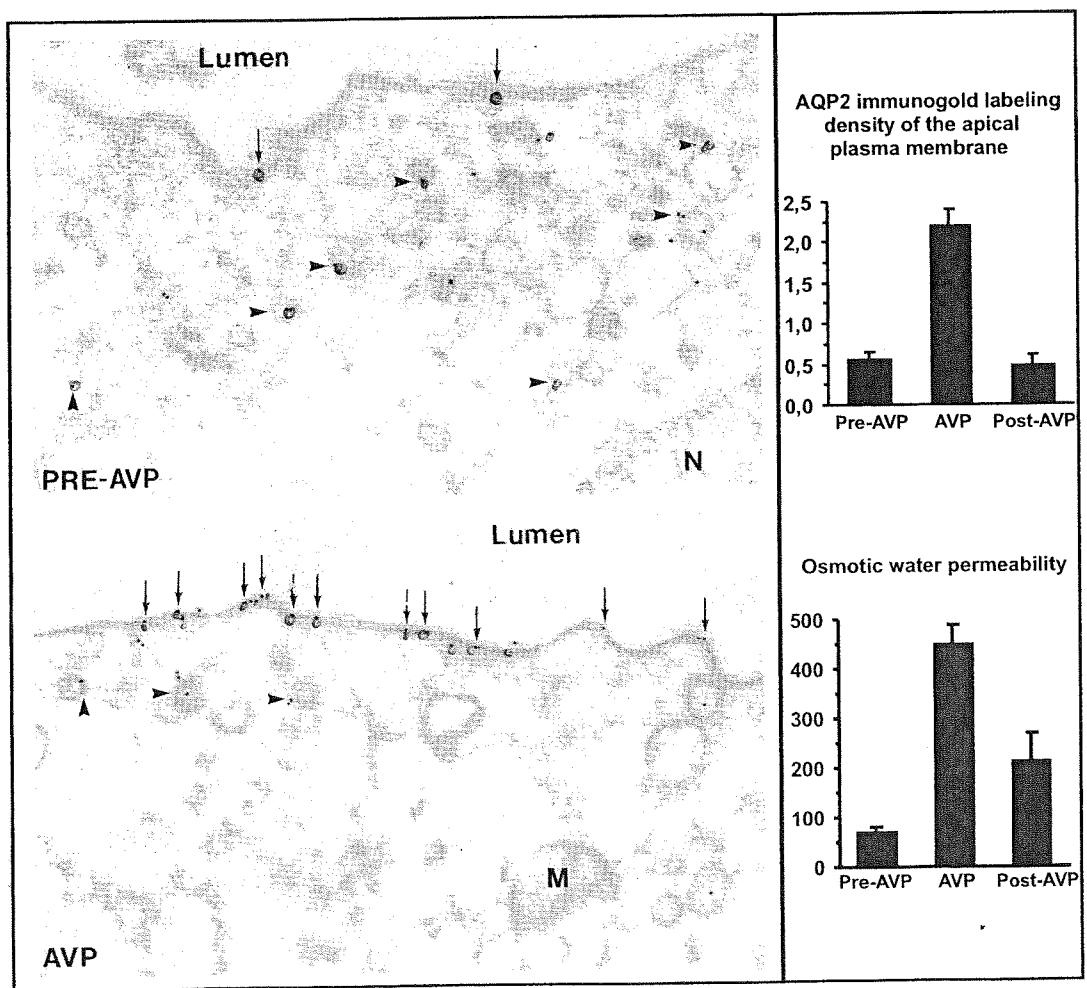


Sites of aquaporin (AQP1) expression in kidney and segmental water-transport function. Proximal nephron: AQP1 is present in apical and basolateral plasma membranes of proximal tubules and thin descending limbs. AQP6 is present in intracellular vesicles of glomerular podocytes and S₂ and S₃ proximal tubules. AQP7 is present in proximal tubules. Distal nephron: aquaporins are not present in ascending limbs. Collecting duct: AQP2 is present in intracellular vesicles and apical plasma membranes of principal cells; AQP3 and AQP4 are present in basolateral membranes. AQP6 is present in intracellular vesicles in type A intercalated cells.

REGULATION DU TRANSPORT D'EAU

AQUAPORINE 2

Dans les cellules principales du collecteur, régulée par l'ADH
AQP2 est localisée dans la membrane apicale et dans des vésicules cytoplasmiques mises en place sous l'effet de l'ADH.



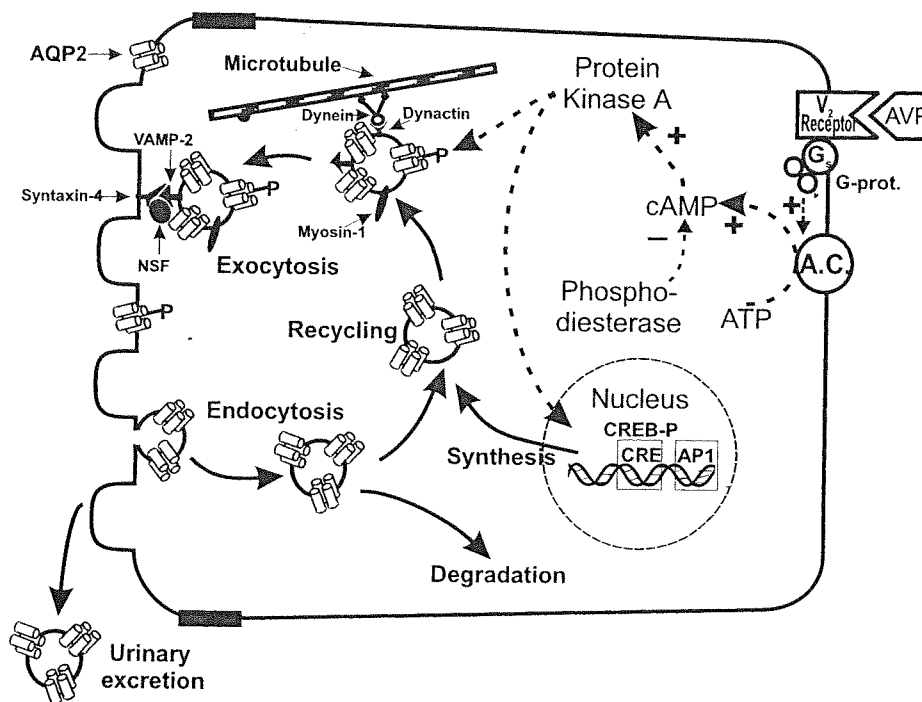
ANTI AQP2 , immuno gold = or colloidal

REGULATION DU TRANSPORT D'EAU

REGULATION DES AQUAPORINES

Court terme : L'ADH (AVP) augmente l'AMPc par un récepteur V₂ couplé à l'adénylate cyclase. L'activation de la protéine kinase A induit une redistribution des vésicules cytoplasmiques contenant AQP2 vers la membrane apicale. Des protéines spéciales (VAMP pour vésicules associated membrane protéines) sur ces vésicules seraient responsables de la fusion des vésicules à la membrane.

Long terme (déshydratation chronique) : L'ADH augmenterait la synthèse d' AQP2 par une action de PKA sur des éléments du gène codant pour AQP2 (CRE pour cAMP response élément)



REGULATION DU TRANSPORT D'EAU

MALADIES ASSOCIEES A UN DYSFONCTIONNEMENT DES AQP

WATER-BALANCE DISORDERS ASSOCIATED WITH AQUAPORIN ABNORMALITIES

Congenital defects

Central diabetes insipidus

Mutation in gene encoding vasopressin (Brattleboro rat)

Nephrogenic diabetes insipidus

Mutations in gene encoding V2 receptor (human, X-linked)

Mutations in gene encoding AQP2 (human, dominant and recessive)

Partial concentration defects

Targeted disruption of gene encoding AQP1 (mouse)

Targeted disruption of gene encoding AQP4 (mouse)

Acquired defects

Lithium treatment

Hypokalemia

Hypercalcemia

Postobstructive nephropathy, unilateral or bilateral

Conditions with water retention

Congestive heart failure

Hepatic cirrhosis

Nephrotic syndrome

Pregnancy

Other conditions

Syndrome of inappropriate ADH secretion

Primary polydipsia

Chronic renal failure

Acute renal failure

Low-protein diet

Age-induced reduction in renal concentration

ADH, antidiuretic hormone