

Vésicules membranaires purifiées : un outil d'étude de la réabsorption rénale

L'utilisation de vésicules membranaires isolées de cellules tubulaires rénales permet d'analyser séparément les systèmes de transport au niveau des membranes luminales et basolatérales. Cette approche a permis notamment de déterminer le rôle respectif, dans les phénomènes de réabsorption rénale, du gradient de sodium, du potentiel électrique transmembranaire et de la diffusion passive des molécules.

Richard Béliveau

Professeur au département de chimie, laboratoire de membranologie moléculaire, université du Québec, Montréal

Chercheur au groupe de recherche en transport membranaire, université de Montréal

Par ses fonctions de transport, la membrane plasmique joue un rôle crucial dans le métabolisme cellulaire. La membrane permet l'absorption des substances nutritives, l'excrétion des déchets et le maintien d'un milieu ionique interne profondément distinct de l'environnement. Les fonctions de transport sont donc d'une importance déterminante pour la survie de la cellule. Bien que les concepts présentés soient valables pour l'ensemble des cellules, notre analyse portera sur les cellules épithéliales du rein qui présentent des fonctions de transport essentielles pour le maintien de l'homéostasie des organismes vivants. Les cellules du tube contourné proximal, où s'effectue la réabsorption, sont caractérisées par une polarité marquée. Cette polarité est à la fois morphologique et fonctionnelle. La membrane apicale, à bordure en brosse, est responsable de la réabsorption des substances filtrées par le glomérule [1-3]. La membrane basolatérale présente des interdigitations prononcées et permet la diffusion des substances réabsorbées par la

cellule vers le sang. Les propriétés très distinctes de ces deux types de membrane sont à la base du transport vectoriel des substances que l'organisme réabsorbe pour assurer sa survie (*figure 1*). L'utilisation de membranes purifiées pour étudier le transport des substances par les cellules a permis un progrès majeur dans la compréhension des phénomènes énergétiques et moléculaires liés à ces processus [4-6]. L'étude de la réabsorption au niveau du tissu entier est extrêmement complexe, en raison des caractéristiques distinctes des deux types de membrane et en raison des interférences causées par le métabolisme intracellulaire. En revanche, la fragmentation de la cellule permet de distinguer la contribution des diverses membranes impliquées. Les transporteurs membranaires peuvent ainsi être étudiés sans interférence avec le métabolisme cellulaire. L'expérimentateur ayant accès aux deux côtés de la membrane cellulaire, peut donc optimiser les paramètres expérimentaux afin d'établir les caractéristiques moléculaires intrinsèques des transporteurs [7-9]. Le contrôle précis de la polarité et de

ADRESSE

R. Béliveau : département de chimie, laboratoire de membranologie moléculaire, université du Québec, CP 8888, succursale A, Montréal, Québec, H3C 3P8 Canada.

RÉFÉRENCES

1. Kinne R, Murer H. Polarity of epithelial cells in relation to transepithelial transport in kidney and intestine. In : Robinson JW, ed. *Intestinal Ion Transport*. Baltimore : University Park Press, 1975 : 79-100.
2. Schultz SG, Curran PF. Coupled transport of sodium and organic solutes. *Physiol Rev* 1970 ; 50 : 637-718.
3. Crane RK. Na⁺-dependent transport in the intestine and other animal tissues. *Fed Proc* 1965 ; 24 : 1000-5.
4. Klip A, Grinstein S, Semenza G. Transmembrane disposition for the phlorizin binding protein of intestinal brush borders. *FEBS Lett* 1979 ; 99 : 91-6.
5. Dousa TP, Kempson SA. Regulation of renal brush border membrane transport of phosphate. *Miner Electrolyte Metab* 1982 ; 7 : 113-21.
6. Hopfer U. Transport in isolated plasma membrane. *Am J Physiol* 1978 ; 234 : F89-96.
7. Quamme GA. Phosphate transport in intestinal brush border membrane vesicles : effect of pH and dietary phosphate. *Am J Physiol* 1985 ; 249 : G168-76.
8. Strevey J, Brunette M, Béliveau R. Effect of arginine modification on kidney brush-border-membrane transport activity. *Biochem J* 1984 ; 223 : 793-802.
9. Béliveau R, Ibnoul-Khatib H. Influence of membrane potential on phosphate transport by luminal membrane from kidney cortex. *International Congress on membranes and membrane processes*. Tokyo, 1987 : 160-1.
10. Lever JE. The use of membrane vesicles in transport studies. *CRC Crit Rev Biochem* 1980 ; 7 : 187-246.

Tableau I AVANTAGES DU SYSTÈME DE VÉSICULES

1. Contrôle de la composition des milieux interne et externe
2. Absence d'interférence de transport par la membrane basolatérale
3. Absence de métabolisme intracellulaire pouvant interagir avec les substrats transportés
4. Les voies paracellulaires ne peuvent interférer avec le transport
5. Utilisation de faibles quantités de produits et de membranes
6. Étude de métabolites instables rendue possible à cause des très courts temps d'incubation (secondes)
7. Étude cinétique et caractérisation moléculaire deviennent possibles

DÉSAVANTAGES DU SYSTÈME DE VÉSICULES

1. Les systèmes de transport étudiés doivent présenter une capacité relativement élevée
2. Difficulté de maintenir les gradients électrochimiques pour des périodes prolongées
3. La charge négative portée par la membrane entraîne la liaison des cations, ce qui rend difficile la mesure de leur transport
4. Possibilité d'altérations causées lors de la purification : perméabilité accrue ou perte de facteurs de régulation

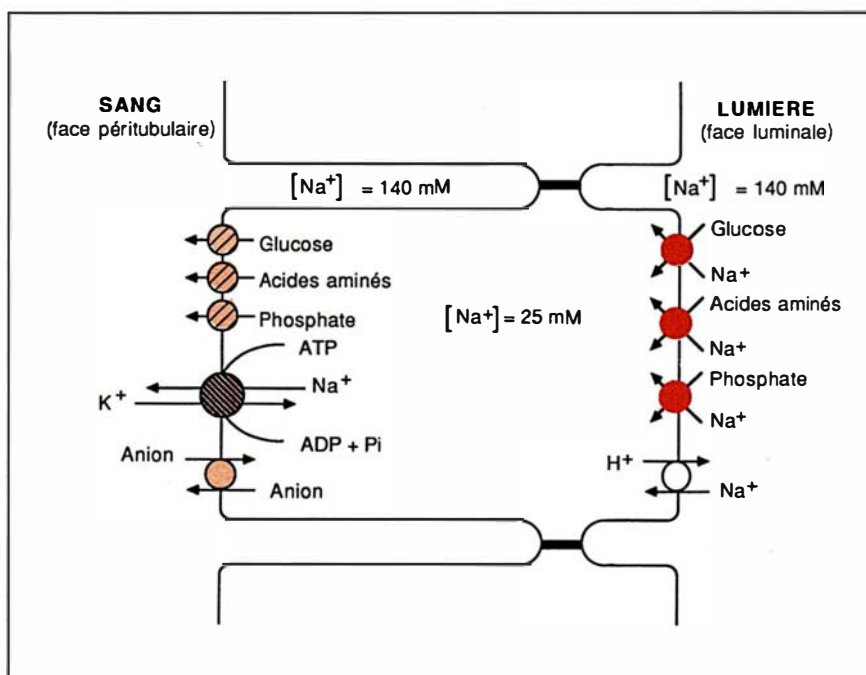


Figure 1. **Réabsorption par les cellules épithéliales.** Le fonctionnement de la Na-K ATPase au niveau basolatéral entraîne la formation d'un important gradient transmembranaire de Na⁺. Les systèmes de transport du côté luminal utilisent l'énergie de ce gradient électrochimique pour réabsorber les substrats contre leur propre gradient électrochimique : c'est un transport actif secondaire. La sortie de ces substrats au niveau basolatéral se fait selon leur gradient de potentiel, sans apport d'énergie : c'est un transport par diffusion facilitée, analogue à celui que l'on retrouve au niveau des cellules non épithéliales.

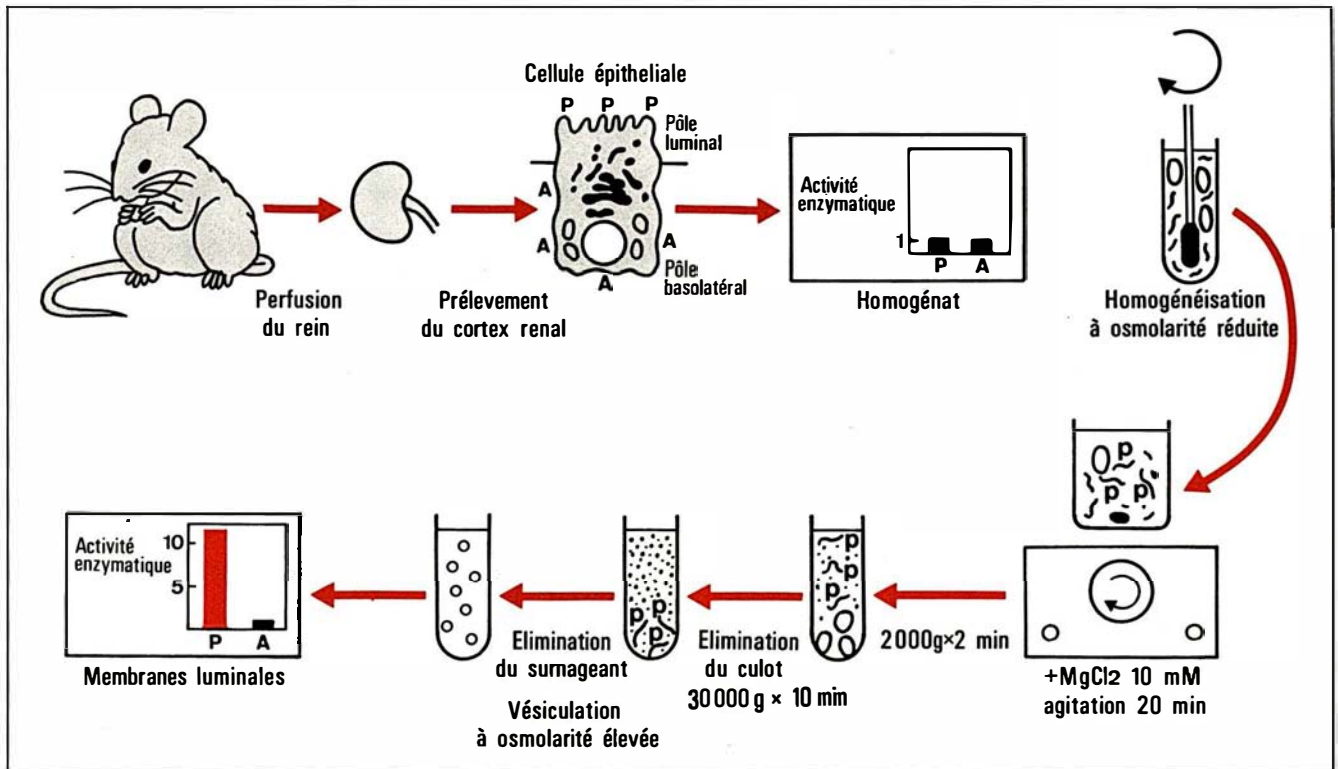


Figure 2. **Fractionnement et purification des membranes.** Le cortex externe du rein, enrichi en tubes contournés proximaux, est prélevé et homogénéisé. L'addition de $MgCl_2$ 10 mM entraîne la précipitation de toutes les membranes cellulaires autres que les membranes luminales qui restent dans le surnageant après une centrifugation à faible vitesse. Une seconde centrifugation à haute vitesse permet de séparer les membranes, le cytosol restant dans le surnageant. Le rétablissement d'une osmolarité normale entraîne la vésiculation spontanée des membranes. La localisation luminale de la phosphatase alcaline (P) et basolatérale de la Na-K ATPase (A) permet de suivre l'enrichissement des membranes luminales, en suivant l'enrichissement en phosphatase alcaline.

la grandeur des forces électrochimiques imposées facilite la mesure des processus de transport. Le fractionnement cellulaire des membranes et la reconstitution des activités de transport permettent donc de réaliser in vitro des situations expérimentales beaucoup plus complexes qu'in vivo, permettant ainsi d'obtenir une image plus claire des systèmes de transport dans la cellule intacte (tableau 1).

Isolement des membranes

Les méthodes utilisées pour l'obtention de vésicules membranaires nécessitent la rupture de la membrane cellulaire, la fragmentation en vésicules et la séparation de ces vésicules du cytoplasme et des autres membranes [10-12]. Un

des systèmes les mieux caractérisés est le système de membranes à bordure en brosse du tube contourné proximal, dans le rein. Les molécules du sang, qui sont filtrées par le glomérule, sont réabsorbées à plus de 95 % par la portion proximale du néphron. Les cellules qui constituent le tube proximal présentent donc une activité de transport très élevée, ce qui en fait un excellent tissu cible pour des études de transport membranaire. Comme les tubes contournés proximaux siègent surtout dans le cortex externe, seule cette région est prélevée (figure 2). Le tissu est ensuite homogénéisé et les membranes luminales sont purifiées par centrifugation différentielle à l'aide d'un traitement au $MgCl_2$ qui précipite toutes les autres membranes cellulaires. Le

rétablissement d'une osmolarité plus élevée induit la vésiculation spontanée des membranes.

Caractérisation des membranes

L'identification des membranes luminales se fait à l'aide de marqueurs enzymatiques. Des études histochimiques ayant déjà démontré que certaines enzymes, telles que la phosphatase alcaline (P), se localisent exclusivement au pôle apical de ces cellules alors que d'autres comme la Na-K ATPase (A) sont localisées dans la membrane basolatérale, il est possible d'utiliser ces enzymes comme marqueurs du type de membrane obtenue [13, 14]. L'activité spécifique de ces deux enzymes est mesurée dans l'homogénat et dans

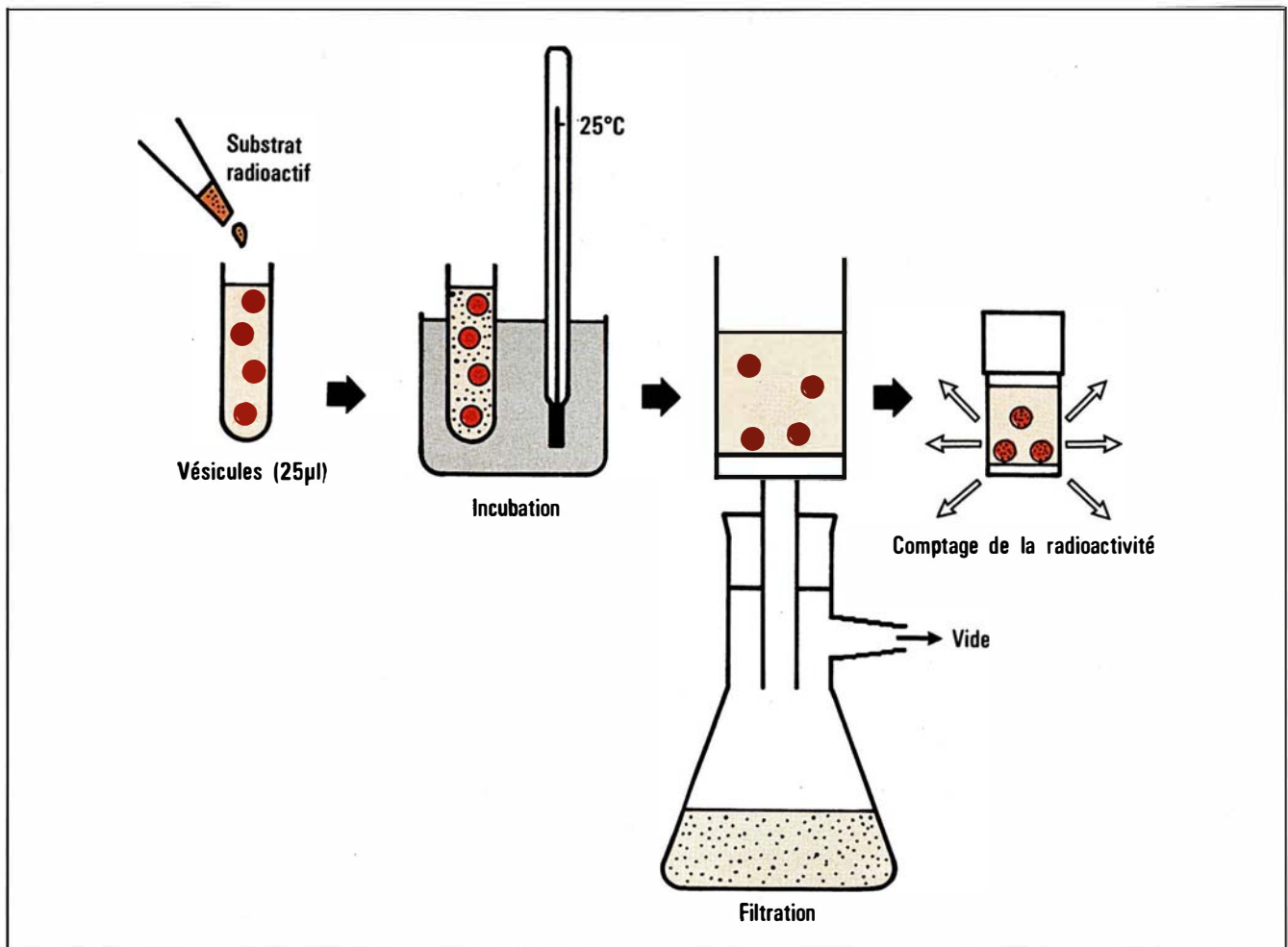


Figure 3. **Mesure du transport.** Le substrat radioactif est ajouté à une suspension de vésicules membranaires. Après un court temps d'incubation, la suspension est versée sur un filtre Millipore (0,45 µM) et filtrée sous vide. Le filtre est lavé avec un milieu d'arrêt, pour enlever le substrat non transporté. Il est ensuite déposé dans une bouteille à scintillation pour la mesure de la radioactivité captée par les vésicules.

la fraction obtenue. On calcule ensuite un facteur d'enrichissement qui est le rapport des deux activités spécifiques et qui indique la pureté relative de la fraction obtenue, par rapport à l'homogénéat initial.

Mesure de transport

La méthode de mesure du transport consiste à incuber des vésicules membranaires en présence d'un marqueur radioactif de la substance étudiée [6]. Les transporteurs présents dans la membrane vont causer une accumula-

tion du produit dans l'espace intravésiculaire (figure 3). Au temps choisi, la réaction est arrêtée en diluant le milieu d'incubation par un milieu glacé. La suspension vésiculaire est alors rapidement versée sur un filtre millipore qui retient les vésicules et leur contenu. Après plusieurs lavages la radioactivité retenue sur le filtre est mesurée.

Il est nécessaire, en tout premier lieu, de distinguer la liaison du produit sur la membrane (adsorption) et le transport à l'intérieur de la vésicule (figure 4). On peut distinguer facilement l'un de

l'autre par des études d'osmolarité [15]. L'espace intravésiculaire étant sensible à l'osmolarité du milieu, une augmentation de l'osmolarité entraîne une diminution du volume intravésiculaire. En incubant des vésicules jusqu'à l'obtention de l'équilibre, dans des milieux d'osmolarité différente, il est possible de mesurer l'effet de l'osmolarité sur la captation de la substance étudiée. La figure 4 présente en graphique la captation en fonction de l'inverse de l'osmolarité. Elle permet de voir qu'à osmolarité infinie ($1/\text{osm} \rightarrow 0$), c'est-à-dire en présence d'un

espace intravésiculaire nul, l'extrapolation des données expérimentales passe par l'origine si la captation mesurée ne reflète que le transport du produit (C). Dans le cas de la liaison du produit à la membrane, un phénomène analogue à l'interaction d'une hormone avec son récepteur, l'extrapolation à osmolarité infinie donne une valeur différente de 0 qui mesure la liaison du produit à la membrane (A). Dans le cas intermédiaire, où la captation est due à la fois à la liaison et au transport, la courbe obtenue indique les deux composantes (B). Cette distinction entre liaison et transport s'avère importante, spécialement dans les cas où les produits étudiés ont un caractère lipophile qui favorise une liaison non spécifique à la membrane et dans le cas des substrats cationiques qui se lient aux charges électro-négatives portées par la membrane.

Gradient de sodium et potentiel électrique

Effet du gradient de sodium sur le transport. Les vésicules purifiées gardent les caractéristiques du tissu dont elles proviennent. La réabsorption rénale des sucres, des acides aminés, des ions phosphates et de beaucoup d'autres substances est sous la dépendance du Na^+ [16-18]. L'absence de sodium dans le filtrat glomérulaire entraîne l'inhibition de la réabsorption de tous ces produits. Ainsi, comme le montre la *figure 5* (page 595), le transport du phosphate est pratiquement nul en l'absence de sodium dans le milieu d'incubation (5-C). Ce transport est alors dû à la simple diffusion du phosphate. Au contraire, l'addition de sodium dans le milieu cause une augmentation du transport du produit, en activant le cotransporteur Na^+ -phosphate (5-A). Le gradient de sodium comporte deux composantes : une composante chimique, qui provient de l'atome de sodium et qui est associée à la spécificité des systèmes de cotransport, et une composante électrique qui est associée à la translocation d'une

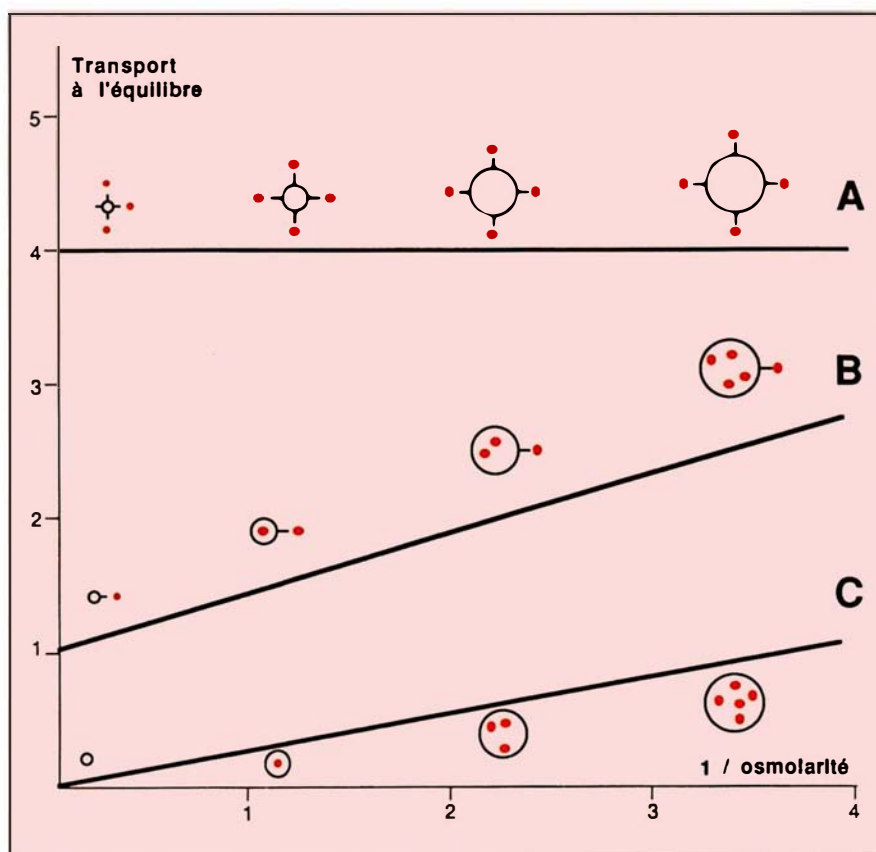


Figure 4. Distinction entre liaison et transport. Les vésicules équilibrées en présence de substrats radioactifs sont incubées dans des milieux d'osmolarité croissante. L'augmentation de l'osmolarité entraîne une diminution du volume intravésiculaire. Dans le cas où le substrat est transporté (courbe C), ceci entraîne une réduction du signal mesuré, alors que dans le cas où le substrat est lié à la membrane (courbe A), la liaison demeure inchangée. Dans le cas où le substrat est lié et transporté (courbe B), on peut distinguer les deux contributions par extrapolation à osmolarité infinie. Notons que les réductions de volume sont représentées de façon schématique et que la fraction réelle de surface occupée par une molécule de substrat lié à une membrane représente moins de 1 %.

charge positive portée par cet atome [19-21]. Afin de distinguer la contribution respective de ces deux composantes dans le transport, il est possible de neutraliser le potentiel électrique et d'étudier le transport en présence de sodium, mais en absence de potentiel électrique. Le potentiel électrique est alors court-circuité par l'addition de l'ion nitrate à concentration élevée (5-B). Cet ion diffuse rapidement à travers la membrane et neutralise la formation de potentiel associée à la translocation d'autres charges. La *figure 5* montre une réduction de

45 % du transport de phosphate dans ces conditions, indiquant qu'une partie de l'énergie nécessaire au transport provient du gradient électrique [9].

Effet du potentiel électrique transmembranaire sur le transport. La plupart des systèmes de cotransport étudiés sont sensibles au potentiel électrique. Cette profonde influence du potentiel sur la réabsorption provient probablement d'une optimisation de ces systèmes. Dans les cellules intactes, le potentiel électrique est modulé très rapidement à travers la membrane. La translocation

RÉFÉRENCES

11. Booth AG, Kenny AJ. A rapid method for the preparation of microvilli from rabbit kidney. *Biochem J* 1974 ; 142 : 575.
12. Mircheff AK. Empirical strategy for analytical fractionation of epithelial cells. *Am J Physiol* 1983 ; 244 : G347-56.
13. Biber J, Stieger B, Haase W, Murer H. A high yield preparation for rat kidney brush border membranes. Different behaviour of lysosomal markers. *Biochim Biophys Acta* 1981 ; 647 : 169-76.
14. Murer H, Kinne R. The use of isolated membrane vesicles to study epithelial transport processes. *J Membr Biol* 1980 ; 55 : 81-95.
15. Murer H, Hopfer U. The functional polarity of the intestinal epithelial cell : Studies with isolated plasma membrane vesicles. In : Kramer F, ed. *Workshop Conference Hoechst vol. 4. Med.*, Amsterdam : Lauterback Excerpta Medica, 1977 : 294-312.
16. Sacktor B. Transport in membrane vesicles isolated from the mammalian kidney and intestine. *Curr Top Bioenerg* 1977 ; 6 : 39-81.
17. Turner RJ, Silverman M. Sugar uptake into brush border vesicles from normal human kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977 ; 74 : 2825-9.
18. Alvarado F. Sodium driven transport. A re-evaluation of the sodium gradient hypothesis. In : Robinson JW, ed., *Intestinal Ion Transport*. Baltimore : University Park Press, 1976 : 117-54.
19. Berteloot A. Highly permeant anions and glucose uptake as an alternative for quantitative generation and estimation of membrane potential differences in brush-border membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1986 ; 857 : 180-8.
20. Gunther RD, Schell RE, Wright EM. Ion permeability of rabbit intestinal brush border membrane vesicles. *J Membr Biol* 1984 ; 78 : 119-27.

d'une centaine d'ions Na^+ /cellule/mV est suffisante pour engendrer un potentiel qui nécessiterait la translocation de millions d'atomes de Na^+ si la seule composante chimique était considérée ; ceci est expliqué par la très faible capacité électrique de la cellule. Le potentiel électrique se construit donc 1 000 fois plus rapidement que le gradient chimique de sodium, lorsque la pompe Na-K ATPase est mise en action. Les possibilités de modulation de la réabsorption par les cotransporteurs sont donc accrues en permettant un contrôle très rapide, de l'ordre de la milliseconde, par le potentiel électrique.

Une des méthodes expérimentales utilisées pour la production d'un potentiel électrique dans les vésicules est l'utilisation d'ionophores comme la valinomycine (figure 6). Les ionophores sont des substances qui augmentent sélectivement la perméabilité des membranes pour certains ions. Ainsi la perméabilité de la membrane pour le potassium est augmentée d'un facteur 40 par l'addition de valinomycine. Cette augmentation est très spécifique, car la valinomycine est 10 000 fois plus sélective pour le K^+ que pour le Na^+ . Le principe de la méthode est simple : les vésicules sont chargées en présence d'un sel de K^+ auquel elles sont peu perméables (par exemple : le gluconate). L'addition de ces vésicules chargées dans un milieu extravésiculaire de transport sans K^+ , en présence de valinomycine, entraîne une sortie massive des ions K^+ , selon leur gradient de potentiel. Cette sortie entraîne à son tour la génération d'un potentiel électro négatif à l'intérieur des vésicules. L'expérience peut aussi se réaliser dans des conditions où le gradient de gluconate de K^+ est dirigé vers l'intérieur. L'entrée massive de K^+ entraîne alors la génération d'un potentiel interne électro positif. Ces deux possibilités sont illustrées sur la figure 6. La formation d'un potentiel négatif stimule l'entrée de glucose, alors qu'un potentiel positif l'inhibe, par rapport à la situation

témoin où le potentiel est court-circuité. La conclusion est évidente : la réabsorption de glucose est associée à la translocation d'une charge positive.

Détermination des constantes cinétiques

Les membranes cellulaires étant relativement imperméables aux sucres, aux acides aminés et aux ions, le passage de ces molécules s'effectue surtout grâce à des molécules transporteuses qui sont des protéines de la membrane présentant une spécificité très élevée pour un type de molécule. On peut facilement déterminer si le transport d'une substance se fait par simple diffusion ou à l'aide d'un transporteur en étudiant l'effet de la concentration d'un produit sur sa vitesse de transport. Comme cela est montré sur la figure 7 (page 596), un système de diffusion assure un transport linéairement relié à la concentration du composé transporté, alors qu'un système par transporteur donne une courbe hyperbolique. Cette courbe hyperbolique correspond à la saturation des sites de transport par le substrat. A partir de cette courbe, il est possible d'extraire les deux constantes cinétiques qui décrivent le processus de transport, soit la constante de Michaelis-Menten (K_m) et la vitesse maximale (V_{max}) du transport [22-26]. Le K_m représente l'affinité que la molécule transporteuse exerce envers son substrat et correspond à la concentration de substrat nécessaire pour atteindre la moitié de la vitesse maximale. La V_{max} correspond à la vitesse maximale atteinte par le système dans les conditions d'étude à pH, force ionique et température donnés.

L'avantage du système de vésicules est qu'il permet de déterminer les constantes cinétiques des transporteurs sur les deux côtés de la membrane, en mesurant la saturation de l'efflux ou de l'influx. A partir de ces mesures, il est possible de montrer que l'aspect vectoriel du transport épithélial est bien l'expression d'une asymétrie

Figure 5. **Génération de potentiel électrique par diffusion anionique.** La captation de phosphate par la membrane se fait par deux voies : une voie par diffusion mesurée en absence de sodium (courbe C) qui reflète la perméabilité passive de la membrane et une voie par cotransporteur, mesurée en présence de sodium (courbes A et B). L'addition de sodium entraîne une stimulation importante du transport par les vésicules. Le rôle du gradient électrique est étudié en générant un potentiel électro négatif interne par le nitrate qui diffuse rapidement à l'intérieur de la vésicule (courbe A). La neutralisation de ce potentiel par le nitrate présent des deux côtés de la membrane (courbe B) permet de conclure que le transport de phosphate dépend également du potentiel électrique ($\Delta\psi$).

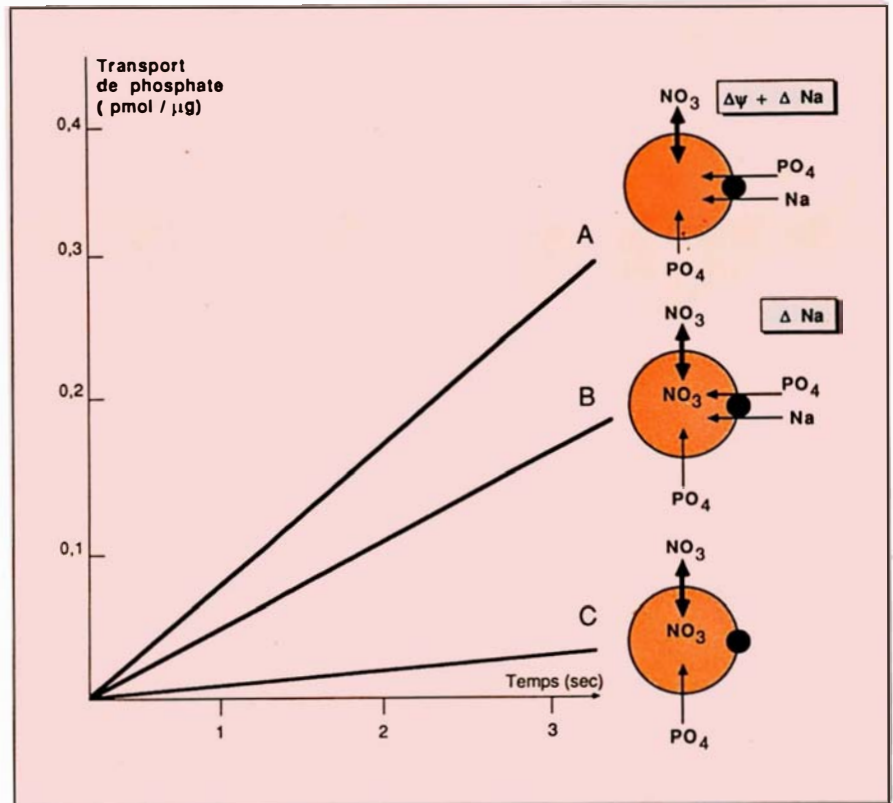
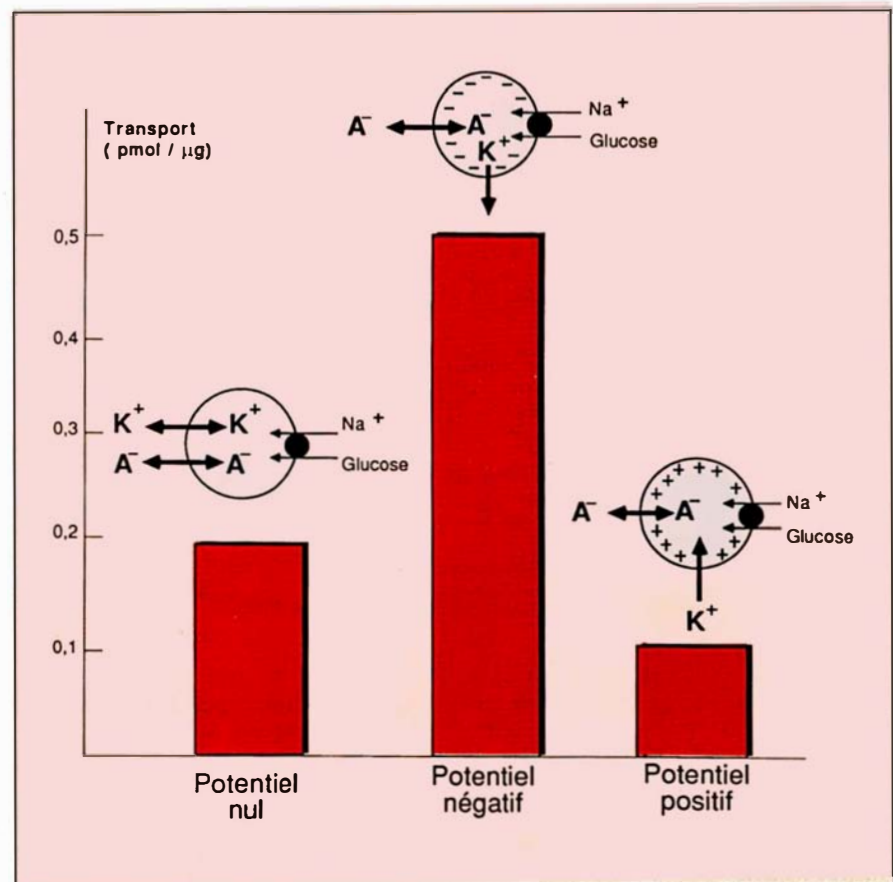


Figure 6. **Effet de potentiel électrique induit par des ionophores.** La valinomycine confère à la membrane une perméabilité très élevée, spécifique pour les ions K^+ . En situation de contrôle à potentiel électrique nul, les ions K^+ sont présents des deux côtés de la membrane et servent à neutraliser toute translocation de charge en se déplaçant pour annuler le potentiel. En présence de gradient de K^+ interne > externe, le flux de K^+ , selon son gradient électrochimique, entraîne la formation d'un potentiel électro négatif interne qui stimule l'entrée de glucose couplée à celle du Na^+ . En présence d'un gradient inversé, on observe une inhibition ($A^- =$ anion).



intrinsèque des systèmes de transport membranaire. Pour le transport de glucose [27] et de phosphate [28], les vitesses initiales sont 10 fois plus élevées en influx qu'en efflux et l'affinité du transporteur est 10 fois plus grande du côté extracellulaire que du côté intracellulaire. Des changements conformationnels des transporteurs sont associés à cette asymétrie [27-29]. Ces résultats, obtenus au cours d'études sur vésicules, expliquent le caractère unidirec-

tionnel de l'absorption au niveau des épithéliums.

Localisation des systèmes de transport

La purification des membranes lumineales et basolatérales a permis de localiser différents systèmes de transport sur ces deux types de membrane (figure 8). Le terme uniport décrit le transport d'un seul substrat, un système symport se réfère au transport couplé d'un

RÉFÉRENCES

21. Crane RK, Dorando FC. On the mechanism of Na^+ -dependent glucose transport. *Ann NY Acad Sci* 1980 ; 339 : 46-52.

22. Bernier M, Strevey J, Brunette MG, Béliveau R. Na^+ transport by brush border membrane from rat kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 1984 ; 123 : 562-8.

23. Mengual R, Leblanc G, Sudaka P. The mechanism of Na^+ -L-lactate co-transport by brush border membrane vesicles from horse kidney. Analysis by isotopic exchange kinetics of a sequential model and stoichiometry. *J Biol Chem* 1983 ; 258 : 15071-8.

24. Turner RJ, Silverman M. Testing carrier models of co-transport using the binding kinetics of non-transported competitive inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 1981 ; 596 : 273-91.

25. Aronson PS. Identifying secondary active solute transport in epithelia. *Am J Physiol* 1981 ; 240 : F1-11.

26. Hopfer U, Liedtke CM. Kinetic features of co-transport mechanism under isotope exchange conditions. *Membr Biochem* 1981 ; 4 : 11-29.

27. Kessler M, Semenza G. The small-intestinal Na^+ -D-glucose co-transporter : an asymmetric gated channel (or pore) responsive to $\Delta\psi$. *J Membr Biol* 1983 ; 76 : 27-56.

28. Béliveau R, Strevey J. Sodium gradient induces conformational changes in renal phosphate carrier. *J Biol Chem* 1987 (sous presse).

29. Pearce RE, Wright EM. Sodium-induced conformational changes in the glucose transporter of intestinal brush border. *J Biol Chem* 1984 ; 259 : 14105-12.

30. Kinne R, Murer H, Kinne-Saffran E, Thees M, Sachs B. Sugar transport by renal plasma membrane vesicles. Characterization of the systems in the brush-border microvilli and basal-lateral plasma membranes. *J Membr Biol* 1975 ; 21 : 375-95.

31. Béliveau R, Brunette MG. The renal brush border membrane in man. *Renal Physiol*, 1984 ; 7 : 65-71.

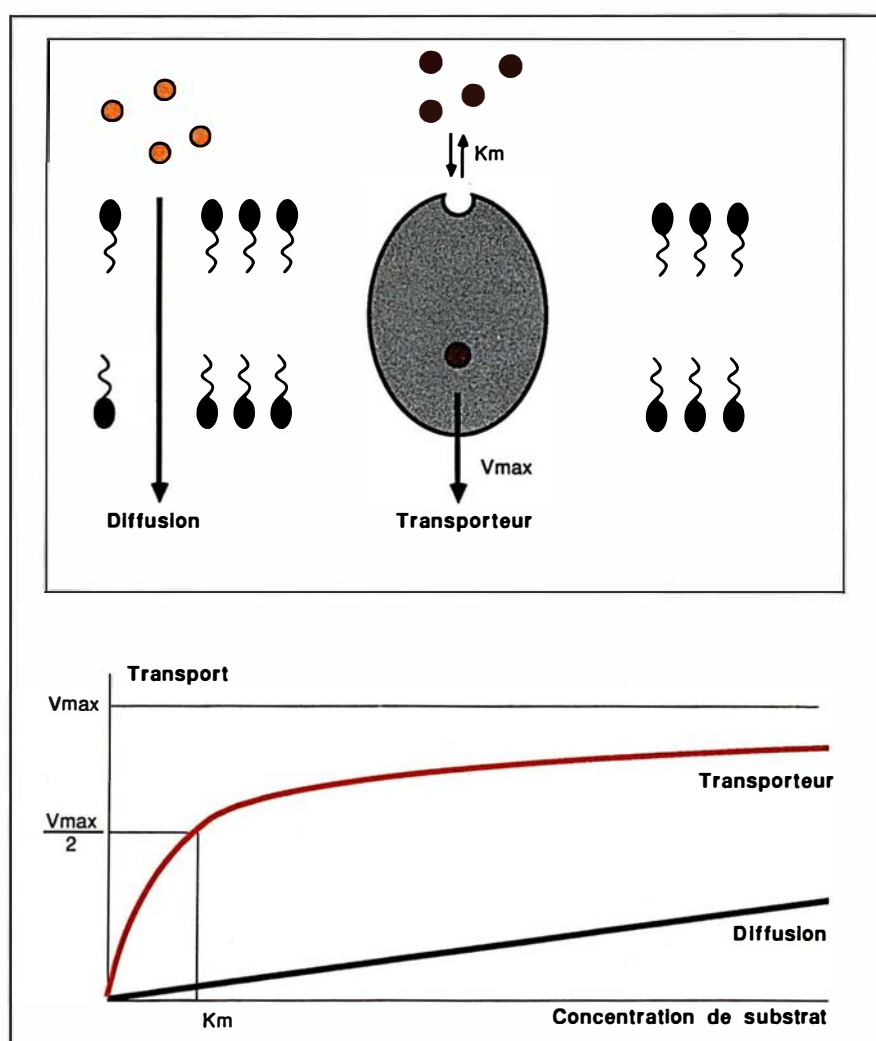


Figure 7. **Transport par diffusion et par transporteur.** La diffusion correspond simplement au passage des molécules au travers de la bicouche lipidique. Ce phénomène n'est donc pas saturable et va augmenter en proportion directe avec la concentration de substrat. Un transporteur est une protéine qui présente une affinité marquée pour un substrat (K_m) et qui permet le passage de ce substrat sous forme de complexe. La vitesse maximale de transport (V_{max}) correspond à la situation où tous les sites de transport sont occupés par des molécules de substrat.


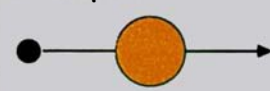
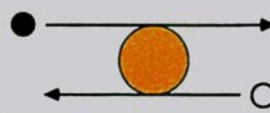
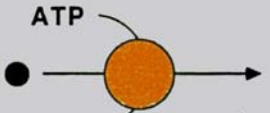
	Membrane luminale	Membrane basolatérale
1- Symport-Na 	Acides aminés Dipeptides D-hexoses Acides biliaires Sulfate Phosphate Intermédiaires du cycle de Krebs Acide ascorbique	Acides aminés acides Acides organiques Glutathion
2- Uniport 	P-aminohyppurate Fructose N-méthylnicotinamide	Acides aminés neutres Sulfate Phosphate Hexose L-lactate
3- Antiport 	Na-H	Na-Ca
4- Pompe ionique 	H-ATPase	Na-K-ATPase Ca-ATPase

Figure 8. Localisation cellulaire des transporteurs membranaires.

substrat et d'un cosubstrat dans la même direction, alors que le système antiport implique le transport du substrat et de son cosubstrat dans des directions opposées. Comme le transport de la plupart des substrats au niveau de la membrane luminale se fait contre un gradient de concentration, on note que la plupart des substances sont transportées à ce niveau par des symports-Na (figure 1). Ces systèmes de cotransport utilisent l'énergie fournie par le gradient électrochimique de Na dont le maintien est assuré par la Na-K ATPase située au niveau basolatéral ; c'est donc un transport actif secondaire. Au niveau de la membrane basolatérale, les études sur vésicules ont montré que le transport de la majorité des substrats se faisait sans participation du Na, par des uniports ; c'est la diffusion facilitée [15]. La

concentration des substrats est en effet plus élevée dans la cellule que dans le milieu sanguin baignant la membrane basolatérale ; l'extrusion de ces produits hors de la cellule ne nécessite donc pas d'apport d'énergie et les produits réabsorbés diffusent simplement dans le sang pour être véhiculés vers les différents tissus.

Il est intéressant de noter que les uniports de la membrane basolatérale présentent une forte analogie avec les transporteurs des cellules non épithéliales. Ainsi le transporteur basolatéral de glucose est fortement inhibé par la phlorétine, un inhibiteur utilisé dans l'étude du transport du glucose dans les cellules non épithéliales telles que les adipocytes et les myocytes. A l'opposé, la phloridzine, un inhibiteur du symporteur luminale, reste impuissante à inhiber le transporteur basolatéral ou

celui des tissus autres que les épithéliums [30]. Les caractéristiques des transporteurs de la membrane basolatérale semblent donc très voisines de celles de la membrane plasmique des cellules non-épithéliales.

Les études sur vésicules ont également mis en évidence l'existence d'un antiport Na-H au niveau luminale [25]. Cet antiport est responsable du contrôle du pH intracellulaire. L'antiport Na-Ca de la membrane basolatérale est impliqué dans le transport du calcium. Notons finalement la présence de pompes ioniques responsables du transport actif primaire localisées dans l'un ou l'autre type de membrane. Les transporteurs de ce type sont des transporteurs de cations : la translocation des ions par ces protéines nécessite la consommation directe d'ATP (figure 8).

L'utilisation des membranes purifiées permet donc la distinction entre le transport réalisé aux deux pôles des cellules épithéliales. Ce système d'étude permet une caractérisation des transporteurs d'un type de membrane donné sans interférence de l'autre, comme c'est le cas dans les cellules entières. Les données obtenues par cette approche permettent donc une meilleure compréhension de la régulation du transport au niveau de la cellule intacte.

Études sur vésicules physiopathologie

Les extrapolations des études in vitro réalisées sur les membranes purifiées aux tissus in vivo et à la physiologie sont multiples. De plus, l'analyse de la composition des membranes en protéines [31] et en lipides [32] permet l'étude des phénomènes de transport anormaux au niveau moléculaire. Prenons l'exemple du rachitisme vitamino-résistant : il a été démontré que la réabsorption rénale des phosphates était diminuée de façon importante dans un modèle animal de cette maladie [33]. L'analyse du transport révèle que l'origine biochimique de cette anomalie se situe au

RÉFÉRENCES

32. Carmel G, Rodrigue F, Carrière S, Le Grimellec C. Composition and physical properties of lipids from plasma membranes of dog kidney. *Biochim Biophys Acta* 1985 ; 818(2) : 149-56.
33. Tenenhouse HS, Scriver CR, McInnes RR, Glorieux F. Renal handling of phosphate in vivo and in vitro by the X-linked hypophosphatemic male mouse ; evidence for a defect in the brush-border. *Kidney Int* 1978 ; 14 : 236-44.
34. Brunette MG, Allard S, Béliveau R. Renal brush border membranes from mice with X-linked hypophosphatemia : Protein composition, phosphate binding capacity and protein kinase activity. *Can J Physiol Pharmacol* 1983 ; 62 : 1394-400.
35. Ives HE, Yee VJ, Warnock DG. Asymmetric distribution of the Na⁺/H⁺ antiporter in the renal proximal epithelial cell. *J Biol Chem* 1983 ; 258 : 13513-61.
36. Kinsella JLT, Kujdik T, Sacktor B. Kinetic studies on the stimulation of Na⁺-H⁺ exchange activity in renal brush border membranes isolated from thyroid hormone-treated rats. *J Membr Biol* 1983 ; 91 (2) : 182.
37. Cohn DE, Klar S, Hammerman MR. Metabolic acidosis and parathyroidectomy increase Na⁺-N⁺ exchange in brush border vesicles. *Am J Physiol* 1983 ; 245 : F217-22.
38. Béliveau R, Bernier M, Vinay P, Tremblay J, Pang SC, Hamet P. Atrial natriuretic factor does not alter sodium transport in purified luminal membrane from rat kidney cortex. *IRCS* 1985 ; 13 : 402-3.
39. Inui KI, Takano M, Okano T, Hori R. H⁺ gradient-dependent transport of aminoccephalosporins in rat renal brush border membrane vesicles : Role of H⁺/organic cation antiport system. *J Pharmacol Exp Ther* 1985 ; 233 : 181-5.
40. Bindels RJM, Geertsen JAM, Vanos CH. Increased transport of inorganic phosphate in renal brush border of spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 1986 ; 250 : F470-4.
41. Bergeron M, Scriver CR. Pathophysiology of renal hyperaminoacidurias and glucosuria. In : Sedlin D, Giebish U, eds. *The kidney : Physiology and pathophysiology*. Baltimore : Raven Press, 1985.

Remerciements

Ce travail a été rendu possible grâce à des subventions de recherche du conseil de recherches médicales du Canada, du conseil de recherche en sciences naturelles et en génie, de la fondation canadienne du rein, du FCAR et de l'université du Québec à Montréal. Je tiens à remercier Yvette Rivard pour son support enthousiaste et les membres du GRTM pour les nombreuses discussions stimulantes.

niveau d'un défaut de réabsorption par les membranes lumineuses [33], bien que la composition en protéines des membranes apparaisse identique par analyse électrophorétique [34]. L'utilisation des vésicules a également permis des progrès importants pour la compréhension des mécanismes reliés à l'acidification urinaire, en mettant en évidence le rôle déterminant joué par l'antiport Na-H dans ce processus [35]. Environ 90 % des bicarbonates filtrés sont réabsorbés grâce à cette sécrétion de protons dans la lumière tubulaire. Cet antiport subit également une modulation par l'hormone thyroïdienne [36] et par la parathormone [37]. Il n'y a cependant pas d'interaction directe entre le facteur natriurétique cardiaque (ANF) et cet antiport. L'ANF n'affecte ni la perméabilité de la membrane ni l'activité de ce transporteur [38], éliminant l'hypothèse d'une action directe de l'hormone sur la réabsorption sodique au niveau de la membrane luminale. Le système de vésicules est également utilisé pour des études de pharmacologie lors de la caractérisation du transport de certains médicaments. On a pu ainsi montrer que les antibiotiques de type aminocéphalosporines partageaient un système de transport avec les cations organiques dans la membrane à bordure en brosse [39]. Mentionnons enfin des travaux sur l'hypertension où l'étude comparative de rats hypertendus et de rats normaux a révélé que l'hypophosphaturie observée chez les hypertendus provenait d'une augmentation de l'activité du transporteur de phosphate de la membrane luminale [40]. Ces quelques exemples illustrent l'importance des résultats obtenus à l'aide des vésicules, dans une perspective physiologique. L'utilisation de membranes purifiées est un outil capital pour analyser les mécanismes moléculaires de nombreuses autres maladies (galactosurie, maladie de Hartnup, cystinurie) où des troubles métaboliques importants sont associés à une altération des systèmes de transport rénaux [41] ■

Summary

The transport of molecules across biological membranes can be studied using purified membranes isolated from tissues such as the kidney. Transport is monitored by measuring the uptake of radioactive material in microvolume. Distinction between apical and baso-lateral transport is made possible through enzyme markers specific for the membrane and this makes identification and enrichment evaluation an easy task. The direct control of the composition of internal and external media provides access to a great variety of experimental conditions and the absence of internal organelles allows transport phenomena to be studied without interference by intermediary metabolism. Electrochemical potentials are easily generated across the purified membrane, allowing studies of the effect of driving forces and electrical potential on carrier properties to be performed. Kinetic studies are feasible by means of Cleland's analysis : characterization of affinities and maximal transport capacity is thus made possible. The information obtained at the molecular level with membrane vesicles is essential in order to understand physiological control and pathological alterations.

TIRÉS A PART

R. Béliveau : département de chimie, laboratoire de membranologie moléculaire, université du Québec, CP 8888, succursale A, Montréal, Québec, H3C 3P8 Canada.