

La régulation pluri-hormonale des fonctions rénales s'effectuerait-elle selon un mode combinatoire ?

Les effets hormonaux sur l'activité cellulaire apparaissent souvent redondants puisque plusieurs hormones peuvent stimuler les mêmes effecteurs intracellulaires. Ainsi, au moins six hormones modulent-elles les fonctions de la partie large de la branche ascendante de l'anse de Henle dans le rein, dont deux des fonctions majeures déterminent la concentration des urines et le taux d'excrétion du magnésium. Or, il est essentiel que ces deux fonctions, dépendant respectivement de la réabsorption du sodium et de celle du magnésium dans ce même segment, soient réglés indépendamment l'une de l'autre. Cela pourrait être la conséquence d'une combinatoire des actions hormonales, chacune se faisant par l'intermédiaire de récepteurs variablement distribués et couplés aux systèmes intracellulaires de transmission du signal, leur combinaison étant synergique ou antagoniste vis-à-vis de certains systèmes effecteurs. Ainsi, quoique chacune des hormones ait individuellement le même type d'effet passant par une augmentation de l'AMP cyclique intracellulaire, leur combinaison variable pourrait imprimer aux systèmes de transport para- et intracellulaires une certaine sélectivité, soit pour le sodium, soit pour le magnésium.

Christian de Rouffignac

ADRESSE

C. de Rouffignac : chef du département de biologie cellulaire et moléculaire. CEA - Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

TIRÉS A PART

C. de Rouffignac.

m/s n° 12 vol. 9, décembre 93

L'explosion des informations relatives aux molécules qui participent aux phénomènes de la vie rend de plus en plus ardu l'exercice de leur hiérarchisation, de leur intégration dans des ensembles cohérents. Parmi les domaines du vivant où cette acquisition exponentielle des connaissances est particulièrement exemplaire, on relève ceux qui tou-

chent à la régulation hormonale des fonctions des cellules rénales et, tout particulièrement, de celles qui participent à l'homéostasie du milieu intérieur. Le foisonnement des données ne permet plus d'assigner à telle ou telle hormone un rôle régulateur précis, sauf pour quelques-unes d'entre elles dont les effets sont immédiats et bien localisés. Pour ces dernières, l'un des meil-

RÉFÉRENCES

1. Beaulieu EE, Kelly PA. *Hormones. From molecules to disease*. Hermann publishers in arts and science, 1990 : 1-708.
2. de Rouffignac C. The urinary concentrating mechanism. In : Kinne R, ed. *Urinary concentrating mechanisms*. Basel : Karger, 1990 : 31-102.
3. de Rouffignac C. Regulation of magnesium excretion. In : *Coe FL, Favus MJ, eds. Disorders of bone and mineral metabolism*. New York : Raven Press, 1992 : 41-55.
4. Greger R. Ion transport mechanism in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. *Physiol Rev* 1985 ; 65 : 760-97.
5. Hebert SC, Andreoli TE. Control of NaCl transport in the thick ascending limb. *Am J Physiol* 1984 ; 246 : 745-56.
6. Morel F, Chabardes D, Imbert-Teboul M, Le Bouffant F, Hus-Citharel A, Montegut M. Multiple hormonal control of adenylate cyclase in distal segments of the rat kidney. *Kidney Int* 1982 ; 21 : 555-62.
7. de Rouffignac C, di Stefano A, Wittner M, Roinel N, Elalouf JM. Consequences of differential effects of ADH and other peptide hormones on the thick ascending limb of mammalian kidney. *Am J Physiol* 1991 ; 260 : 1023-35.
8. de Rouffignac C, Corman B, Roinel N. Stimulation by antidiuretic hormone of electrolyte tubular reabsorption in rat kidney. *Am J Physiol* 1983 ; 244 : 156-64.
9. Morel F, Imbert-Teboul M, Chabardes D. Receptors to vasopressin and other hormones in the mammalian kidney. *Kidney Int* 1987 ; 31 : 512-20.
10. Elalouf JM, Bühler JM, Tessiot C, Belanger AC, Dublineau I, de Rouffignac C. Predominant expression of $\beta 1$ -adrenergic receptor in the thick ascending limb of rat kidney: absolute mRNA quantitation by reverse transcription and polymerase chain reaction. *J Clin Invest* 1993 ; 91 : 264-72.
11. Borensztein P, Juvin P, Vernimmen C, Poggioli J, Paillard M, Bichara M. cAMP-dependent control of Na^+/H^+ antiport by AVP, PTH and PGE_2 in rat medullary thick ascending limb cells. *Am J Physiol* 1993 ; 264 : 354-64.

leurs exemples est celui de l'hormone antidiurétique à laquelle on attribue, par son action exclusive sur la perméabilité à l'eau des canaux collecteurs du rein *via* des récepteurs « V_2 » que l'on ne trouve que dans cet organe, un rôle essentiel dans le maintien à court terme de la stabilité de la balance hydrique de l'organisme. Mais, pour la majorité des hormones, la situation est loin d'être aussi claire. Peut-on, aujourd'hui, désigner sans ambiguïté les hormones qui assurent l'homéostasie d'éléments aussi essentiels que le magnésium, le potassium, les bicarbonates, le chlore, etc. voire même le sodium? Tentons, par

quelques schémas simples, d'en cerner la difficulté.

Les réseaux de communication

Les hormones [1] sont des petites molécules libérées par des systèmes glandulaires, véhiculées par le sang à des concentrations infinitésimales (10^{-10} à 10^{-12}M) et qui, par leur action sur des cellules cibles, assurent la stabilité de notre milieu intérieur. La notion selon laquelle l'hormone porte, dans sa structure moléculaire, toute l'information de la nature de la fonction à accomplir a fait long feu pour faire place à celle,

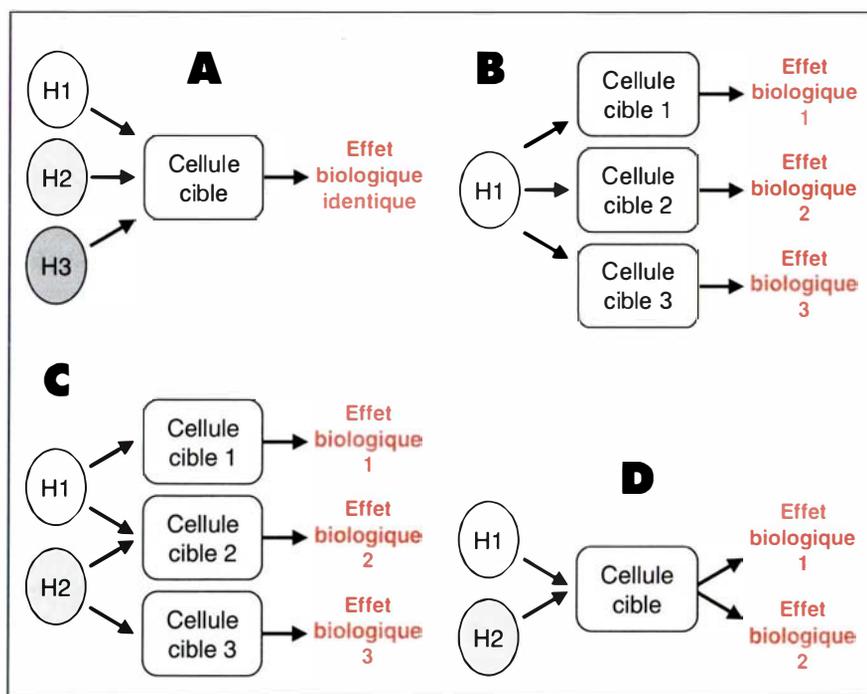


Figure 1. **Les réseaux de communication extracellulaires.** Plusieurs hormones agissant sur la même cellule, via une voie de transduction unique, peuvent induire des effets physiologiques identiques (A). Ce cas est illustré par la similitude des effets de l'hormone antidiurétique, de la calcitonine, du glucagon, de l'hormone parathyroïdienne et d'un agoniste β adrénergique, sur le transport des électrolytes par la branche large ascendante. A l'inverse, une même hormone exerçant son action sur diverses cellules cibles peut moduler des fonctions physiologiques différentes (B). C'est le cas, par exemple, de l'hormone antidiurétique qui, par son action sur le système adénylate-cyclasique, peut soit amplifier le transport des électrolytes par la branche large ascendante, soit augmenter la perméabilité à l'eau des canaux collecteurs, soit encore stimuler le transport de l'urée dans les segments terminaux de ces canaux. Ces deux cas (A et B) peuvent se combiner (C). Enfin, des hormones agissant sur une même cellule, mais par des voies de transduction différentes, peuvent induire des effets différents (D) : sur le tubule proximal, l'hormone parathyroïdienne par son action sur le système adénylate-cyclasique inhibe l'activité de l'antiport Na^+/H^+ de la membrane apicale, alors que l'angiotensine II par une action sur la voie de la phospholipase C stimule cette activité.

toujours valide, qui assigne à la cellule cible elle-même un rôle majeur dans l'expression de cette fonction. Ce concept repose sur deux observations très générales. Des hormones de nature très différente peuvent susciter la même réponse physiologique de la cellule cible (figure 1A). La contraction des muscles lisses peut être provoquée indifféremment par l'adrénaline, l'histamine et l'angiotensine; de même, la transcription des gènes, le métabolisme des graisses brunes, etc. sont autant de phénomènes soumis à un contrôle pluri-hormonal. A l'inverse (figure 1B), une même hormone peut exercer un effet sur des types cellulaires divers, accomplissant dans

chaque cas une action spécifique, dépendant du type cellulaire concerné. En outre, si l'on intègre la notion de temps, on s'aperçoit qu'une même hormone peut induire un certain effet cellulaire à un moment donné puis, si l'hormone reste liée à la cellule cible, des effets de plus en plus tardifs et très différents les uns des autres. Une telle réponse pléiotropique a été observée pour la première fois pour l'insuline qui induit des réponses précoces (une augmentation de la réabsorption des sucres, des acides aminés ou des ions à travers une membrane plasmique, par exemple), puis tardives (synthèses protéiques) pouvant aboutir à des

modifications phénotypiques ou même à la division cellulaire. Bien entendu, la faculté pour différentes hormones de produire le même effet et celle pour une hormone de susciter des effets divers peuvent se combiner, ajoutant ainsi un nouveau degré de liberté (figure 1C). A ce système de régulation hormonale qui s'organise, on le voit, en réseaux de communications, il faut ajouter un degré de complexité supplémentaire, car une cellule donnée peut avoir, elle-même, la capacité d'assurer des fonctions régulatrices de natures très diverses (figure 1D). Nous verrons que ce cas se vérifie tout particulièrement dans le rein qui est, par excellence, l'organe régulateur du milieu intérieur. Les mécanismes qui permettent à une même hormone d'induire sur un même type cellulaire des réponses différentes commencent à être bien compris. Prenons le cas des hormones dont les récepteurs sont membranaires (figure 2). On sait que la liaison de l'hormone à son récepteur entraîne un couplage, *via* une protéine G, avec une enzyme amplificatrice, elle-même localisée dans la membrane plasmique de la cellule en contact avec le sang. Les enzymes amplificatrices (l'adénylate-(guanylate)-cyclase et la phospholipase C) permettent de produire, à partir d'un signal hormonal ténu (10^{-12} à 10^{-10} M), des seconds messagers dont la concentration atteint 10^{-7} à 10^{-4} M dans la cellule. Ces seconds messagers vont à leur tour activer des voies de transduction, chaque cascade biochimique aboutissant à l'activation de protéines effectrices, responsables de l'effet physiologique final. On observe que des récepteurs de différentes hormones peuvent être couplés à une même enzyme, et que des récepteurs d'une même hormone peuvent être couplés à plusieurs enzymes amplificatrices. Les voies de transduction peuvent exercer des influences inhibitrices, permissives, ou exaltatrices, en amont ou en aval des enzymes. Le système de régulation hormonale de la réponse cellulaire constitue donc, là encore, un réseau hiérarchisé de communications complexe à l'intérieur même de la cellule.

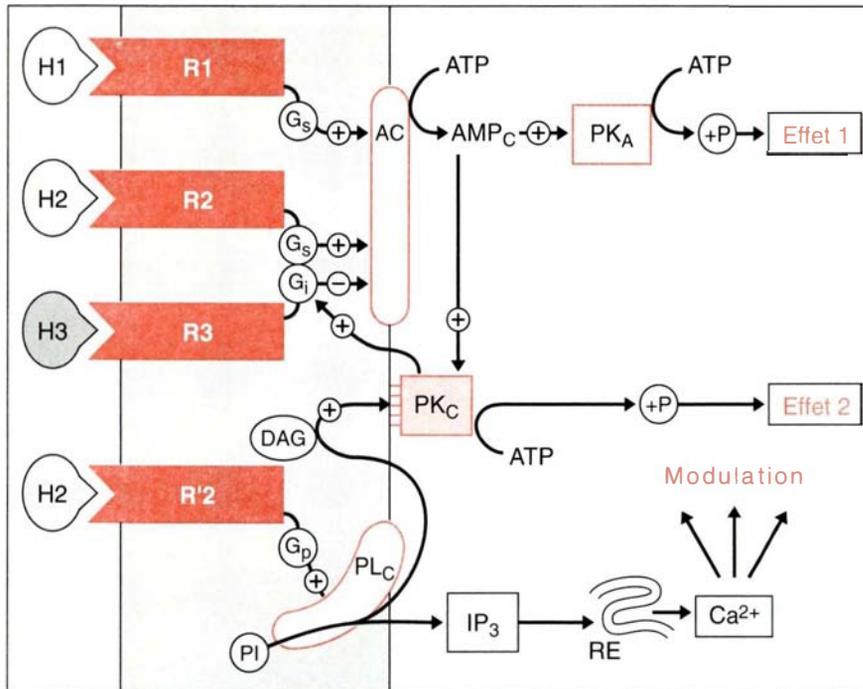


Figure 2. **Les réseaux de transduction intracellulaires.** Ce schéma illustre quelques interactions entre les voies de transduction existant dans la plupart des cellules épithéliales. Les récepteurs de deux hormones différentes (R_1 et R_3) peuvent être couplés à une même voie de transduction (adénylate-cyclase) par l'intermédiaire d'une protéine G_s (stimulatrice) ou G_i (inhibitrice); les sous-types d'un récepteur d'une même hormone (R_2 et R'_2) peuvent être couplés à des voies de transduction différentes (adénylate-cyclase, phospholipase C). Des effets modulateurs (d'exaltation + ou de répression -) peuvent s'exercer en amont ou en aval de l'adénylate-cyclase. On conçoit que le taux d'occupation de ces récepteurs place la cellule dans une configuration privilégiant l'une ou l'autre des réponses physiologiques. AC = adénylate-cyclase; PLC = phospholipase C; ATP = adénosine triphosphate; AMPc = adénosine monophosphate cyclique; PK_A = protéine kinase A; PK_C = protéine kinase C; PI = phosphatidyl inositol 4,5 bisphosphate; IP_3 = inositol-triphosphate; DAG = diacylglycerol; RE = réticulum endoplasmique; + P = phosphorylation.

RÉFÉRENCES

12. Mandon B, Siga E, Roinel N, de Rouffignac C. Insulin stimulates NaCl, Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ transport in the thick ascending limb of the mouse nephron. Cross potentiation with AVP. *Am J Physiol* 1993; 265: 361-9.
13. Gammeltoft S, Van Obberghen E. Protein kinase activity of the insulin receptor. *Biochem J* 1986; 235: 1-11.
14. Schmale H, Richter D. Single base deletion in the vasopressin gene causes diabetes insipidus in Brattleboro rats. *Nature* 1984; 308: 705-9.
15. de Rouffignac C, Elalouf JM, Roinel N. Physiological control of the urinary concentrating mechanism by peptide hormones. *Kidney Int* 1987; 31: 611-20.
16. Harrington AR, Valtin H. Impaired urinary concentration after vasopressin and its gradual correction in hypothalamic diabetes insipidus. *J Clin Invest* 1968; 47: 501-10.
17. Humes HD, Simmons CF, Brenner BM. Interaction between antidiuretic and parathyroid hormones on urine concentration. *Am J Physiol* 1980; 239: 244-9.
18. Elalouf JM, Chabane-Sari D, de Rouffignac C. Additivity of the effects of glucagon and vasopressin on renal Mg reabsorption and urine concentration ability in the rat. *Pflügers Arch* 1986; 407: 566-79.
19. Bouby N, Trinh-Trang-Tan MM, Bankir L. Stimulation of tubular reabsorption of magnesium and calcium by antidiuretic hormone in conscious rats. Study in Brattleboro rats with hereditary hypothalamic diabetes insipidus. *Pflügers Arch* 1984; 402: 458-64.
20. Wittner M, Mandon B, Roinel N, de Rouffignac C, di Stefano A. Hormonal stimulation of Ca²⁺ and Mg²⁺ transport in the cortical thick ascending limb of Henle's loop of the mouse: evidence for a change in the paracellular pathway permeability. *Pflügers Arch* 1993; 423: 387-96.
21. Karbach U, Rummel W. Cellular and paracellular magnesium transport across the terminal ileum of the rats and its interaction with the calcium transport. *Gastroenterology* 1990; 98: 985-92.
22. Stevenson BR, Anderson JM, Braun ID, Mooseker MS. Phosphorylation of the tight junction protein ZO-1 in two strains of Madin-Darby canine kidney cells which differ in transepithelial resistance. *Biochem J* 1989; 263: 597-9.

On voit donc que c'est l'association d'un réseau de communications complexe, externe à la cellule, et d'un réseau intracellulaire de communications, tout aussi complexe, qui assure la régulation de chaque élément qui entre dans la composition du milieu intérieur. La difficulté que l'on rencontre lorsque l'on veut assigner aux hormones un rôle régulateur résulte, pour une large part, de notre incapacité actuelle à intégrer dans un ensemble cohérent les deux réseaux de communication intra- et extracellulaire.

On conçoit que l'effet biologique final puisse dépendre de la configuration du réseau de communication interne de la cellule. Comment s'organiserait cette mise en configuration? On voit mal comment une seule et même hormone pourrait y parvenir. La situation pourrait être différente si l'on envisage une action combinée de plusieurs hormones sur la cellule cible. En effet, à partir des données accumulées sur la régulation des fonctions rénales au cours de ces dernières années, il ressort que chacun des types cellulaires étudiés à ce jour fait l'objet d'une régulation pluri-hormonale. On est toujours incapable, à l'heure actuelle, d'en saisir la signification physiologique. C'est ici que le concept qui vient d'être évoqué pourrait prendre tout son sens: la nature de la réponse régulatrice ne pourrait-elle pas être liée, non à l'augmentation du taux circulant d'une hormone bien spécifique, mais à la combinaison particulière de plusieurs de ces hormones? Ne serait-il pas possible que ce soit le profil de la distribution de tout ou partie de ces hormones dans le sang circulant qui puisse installer les réseaux de transduction intracellulaires selon une configuration donnée?

Un exemple de régulation pluri-hormonale : la branche large ascendante de l'anse de Henle

Il s'agit d'un segment du néphron auquel on reconnaît, parmi toutes celles qu'il assure, deux fonctions régulatrices très spécifiques (figure 3).

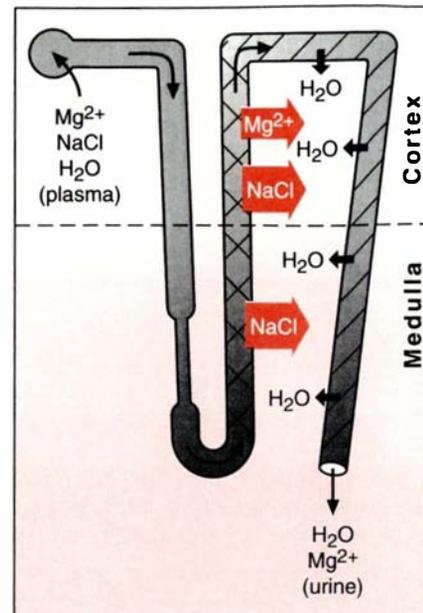


Figure 3. Rôle de la branche large ascendante de l'anse de Henle dans l'homéostasie de l'eau et du magnésium. Ce segment du néphron (trame en croisillons) reçoit de la branche descendante un fluide dont la concentration en sels minéraux (Na⁺, Mg²⁺ notamment) est plus élevée que dans le sang systémique, en raison de l'effet d'un mécanisme de multiplication de concentration par contre-courant, particulier au rein [2]. La branche large ascendante réabsorbe une grande partie du sodium et du magnésium qui lui est délivrée. Le sodium est réabsorbé sur toute la longueur du segment, qui est par ailleurs imperméable à l'eau. Ce sodium s'accumule dans le milieu interstitiel qui devient progressivement hypertonique, tandis que le fluide tubulaire se dilue. En présence d'hormone antidiurétique, le tubule distal et les canaux collecteurs localisés en aval de l'anse (trame hachurée) sont très perméables à l'eau. De l'eau est donc réabsorbée de façon à équilibrer la pression osmotique du fluide tubulaire avec celle des milieux hypertoniques environnants, ce qui conduit à l'excrétion d'une urine plus concentrée que le plasma. Le magnésium n'est réabsorbé que dans la seule portion corticale de la branche large ascendante. Au-delà, les mouvements de magnésium restent très limités. L'amplitude des réabsorptions du sodium et du magnésium fixe donc les débits d'excrétion de l'eau et du magnésium par le rein.

Ce segment est le « moteur » du mécanisme de multiplication de concentration par contre-courant du rein des mammifères [2]. C'est lui qui, par une réabsorption de NaCl non accompagnée d'eau, engendre le gradient longitudinal de pression osmotique tissulaire, s'étendant du sommet du cortex à l'extrémité de la papille rénale. L'hormone anti-diurétique, libérée par la neurohypophyse lors d'une élévation de la pression osmotique sanguine, augmente la perméabilité à l'eau des segments tubulaires situés en aval de l'anse de Henle. Le fluide qui les parcourt peut alors équilibrer, de proche en proche, sa pression osmotique avec celle des tissus environnants. En présence d'hormone anti-diurétique, la concentration atteinte par l'urine à l'extrémité des canaux collecteurs dépend de l'amplitude du gradient de concentration cortico-papillaire et donc du travail osmotique accompli par la branche large ascendante. Ce segment du néphron joue, on le voit, un rôle clé dans le processus de concentration urinaire et, par là, dans celui de l'économie de l'eau. Mais il accomplit aussi une autre fonction. C'est, en effet, lui qui effectue près de 80 % de la réabsorption du magnésium filtré par le rein [3]. Une variation, même légère, de la quantité de magnésium réabsorbée à ce niveau se répercute quasi intégralement dans l'urine excrétée. Autrement dit, ce segment assure l'essentiel de la fonction régulatrice du rein vis-à-vis de l'homéostasie du magnésium.

La branche large ascendante est composée de deux épithéliums tubulaires, l'un situé dans la médulla, l'autre dans le cortex, chacun ne comportant qu'un seul type cellulaire. Les deux types cellulaires de cet ensemble sont cependant très voisins l'un de l'autre, ce qui confère aux deux épithéliums de nombreuses caractéristiques communes [4, 5]. Chaque cellule recèle, dans ses membranes basolatérales, plusieurs types de récepteurs hormonaux au nombre desquels on compte ceux couplés au système adénylate-cyclasique. Chez la souris, on dénombre cinq de ces récepteurs dans le segment cortical, sensibles à la calcitonine, à l'hormone parathy-

roïdienne, à l'hormone anti-diurétique, au glucagon et aux β_1 adrénergiques [9, 10]. Dans le segment médullaire, on ne retrouve des récepteurs sensibles qu'aux trois dernières hormones. Il y a une dizaine d'années, sur la base d'expériences démontrant la non-additivité des effets de ces hormones sur l'activité adénylate-cyclasique de ces cellules [6], Morel et son équipe, au Collège de France, sont arrivés à la conclusion qu'elles doivent toutes stimuler un unique et même *pool* d'enzymes. Puisque l'adénylate-cyclase commande la formation intracellulaire

d'AMP cyclique, lui-même responsable de l'effet physiologique final, cela signifiait que toutes ces hormones devaient entraîner la même réponse cellulaire. Cela fut vérifié [7], *in vitro* (figure 4), grâce à l'utilisation d'une technique de microperfusion de tubules isolés, et *in vivo* par la mise en œuvre d'une nouvelle stratégie de recherche découlant de cette théorie (voir encadré p. 1377). Dans le segment cortical, ces hormones augmentent toutes le transport de chlorure de sodium et, en parallèle, celui du calcium et du magnésium. Dans le

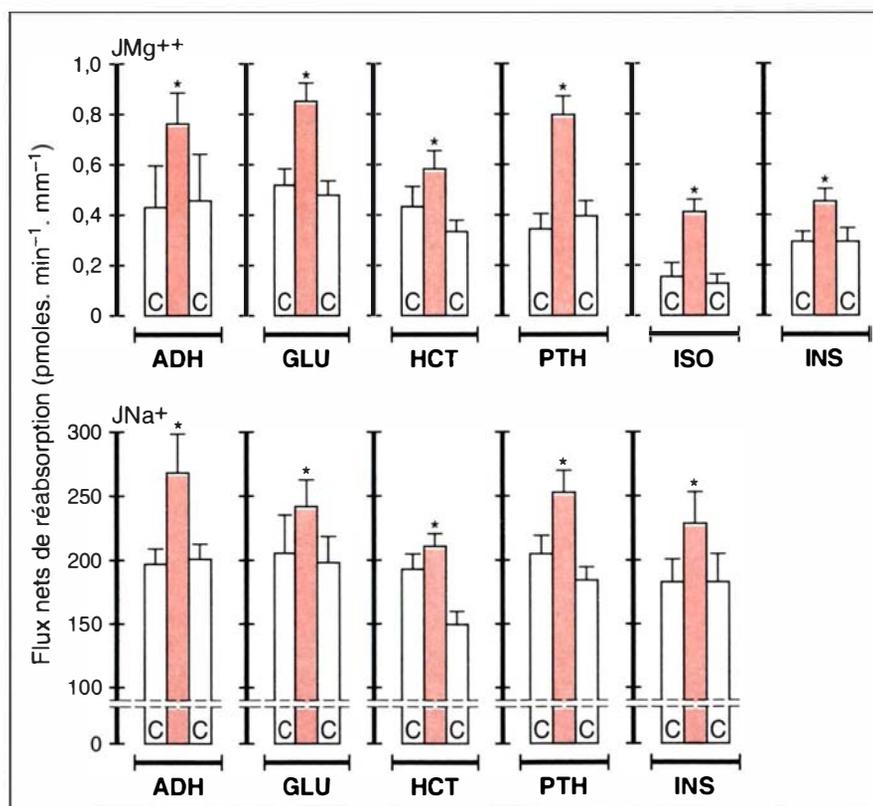
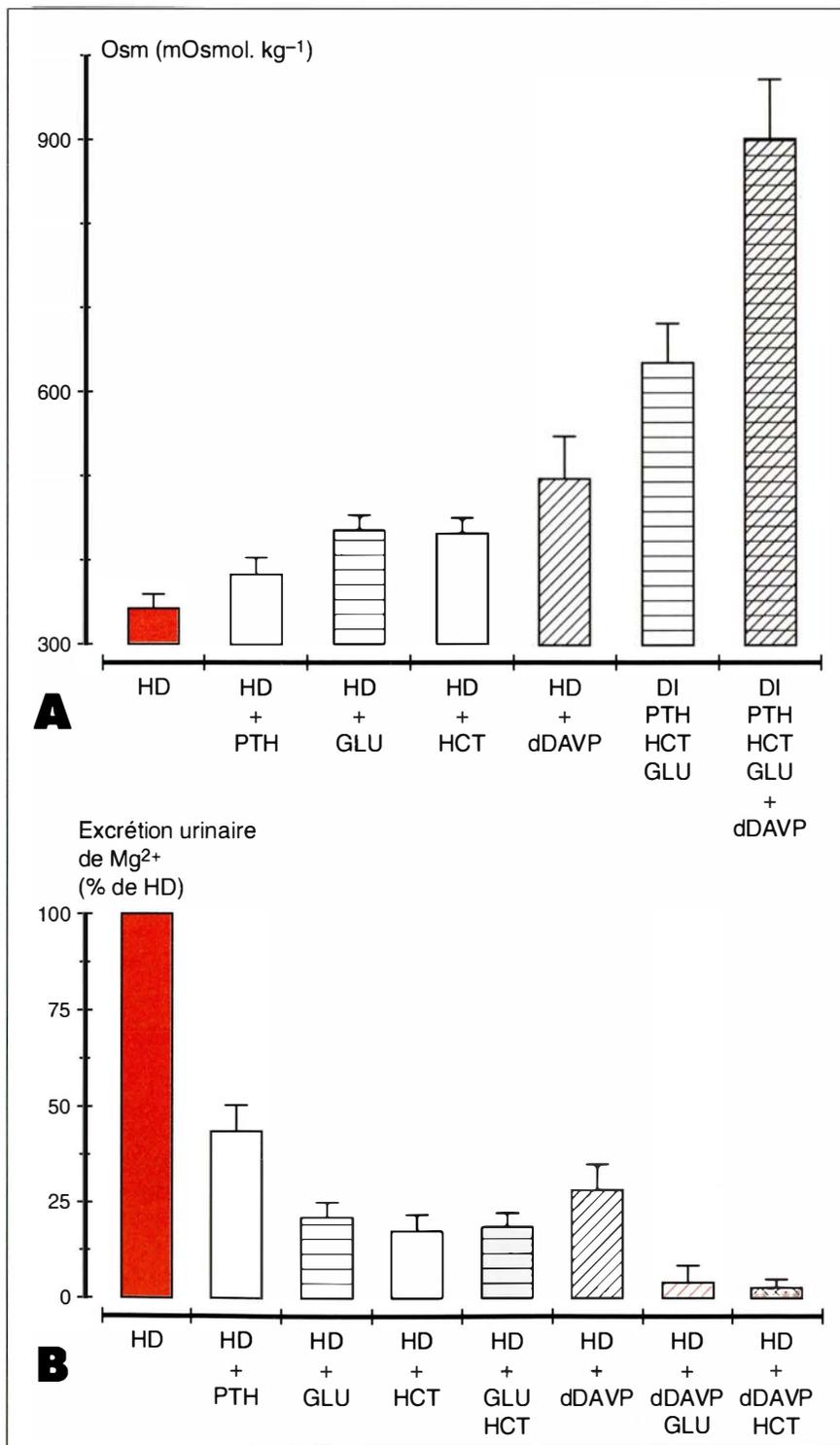


Figure 4. **Similitude des effets de différentes hormones sur les flux nets de réabsorption du magnésium ($J_{Mg^{2+}}$) et du sodium (J_{Na^+}) par le segment cortical de la branche large ascendante.** Les tubules sont prélevés par microdissection et perfusés *in vitro* à débit constant, à raison de 2 nl/min environ. Le fluide qui a transité dans le tubule est collecté à sa sortie, par périodes de 10 min. Sa composition électrolytique est déterminée à l'aide d'une microsonde de Castaing. Après une période témoin (colonne C), l'hormone est ajoutée dans le bain externe (colonnes roses surmontées d'un astérisque indiquant que la différence est significative par rapport aux colonnes C) puis retirée (seconde colonne C). L'écart type à la moyenne est indiqué par le segment surmontant les moyennes. ADH = hormone anti-diurétique; GLU = glucagon; HCT = calcitonine humaine; PTH = hormone parathyroïdienne; ISO = isoprotérénol, un agoniste β adrénergique; INS = insuline.

RÉFÉRENCES

23. Quamme GA, Dirks JH. Magnesium transport in the nephron. *Am J Physiol* 1980; 239: 393-401.
24. Hruska KA, Moskowitz D, Esbrit P, Citivelli R, Westbrook S, Huskey M. Stimulation of inositol triphosphate and diacylglycerol production in renal tubular cells by parathyroid hormone. *J Clin Invest* 1987; 79: 230-9.
25. Burnatowska-Hedlin MA, Spielman WS. Vasopressin V_1 receptors on the principal cells of the rabbit cortical collecting tubule. Stimulation of cytosolic free calcium and inositol phosphate production *via* coupling to a pertussis toxin substrate. *J Clin Invest* 1989; 83: 84-9.
26. Nitschke R, Fröbe U, Greger R. Antidiuretic hormone acts *via* V_1 receptors on intracellular calcium in the isolated perfused rabbit cortical thick ascending limb. *Pflügers Arch* 1991; 417: 622-32.
27. de Rouffignac C, di Stefano A, Wittner M, Chabane-Sari D, Elalouf JM. The renal handling of magnesium. In: Lasserre B, Durack J, eds. *Magnesium a relevant ion*. Paris, Londres: John Libbey Eurotext, 1991: 145-67.
28. Firsov D, Mandon B, Siga E, Bellanger AC, Buhler JM, de Rouffignac C, Elalouf JM. Quantitative RT-PCR analysis of V_{2L} , V_{2S} and V_{1A} vasopressin receptor mRNAs along the rat nephron. *J Am Soc Nephrol* 1993; 4: 852.
29. Kukstas IA, Domec C, Bascles L, Bonnet J, Verrier D, Israel JM, *et al.* Different expression of the two dopaminergic D_2 receptors, D_{2-415} and D_{2-444} , in two types of lactotroph each characterized by their response to dopamine, and modification of expression by sex steroids. *Endocrinology* 1991; 129: 1101-3.
30. Vincent JD. Endocrinology. In: Boyd CAR, Noble D, eds. *The logic of life: the challenge of integrated physiology*. Oxford University Press, 1993: 147-67.
31. Demotes-Mainard J, Vincent JD. Hormonal control of dopamine receptor sensitivity: modulation of D_2 receptor function in brain and pituitary. *Arch Int Physiol Biochim Biophys* 1993; 101: 73.
32. Dublaineau I, Pradelles P, de Rouffignac C, Elalouf JM. Differential short-term desensitization to vasopressin, isoproterenol, glucagon, parathyroid hormone and calcitonin in the thick ascending limb of rat kidney. *Pflügers Arch* 1992; 420: 16-22.
33. Gierer A. Molecular models and combinatorial principles in cell differentiation and morphogenesis. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology: chromosome structure and function*, 1974; 38: 951-61.
34. Johnson PF, McKnight SL. Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Annu Rev Biochem* 1989; 58: 799-839.
35. Shafik IM, Quamme GA. Early adaptation of renal magnesium reabsorption in response to magnesium restriction. *Am J Physiol* 1989; 257: 974-7.
- segment médullaire, elles n'augmentent que le transport de chlorure de sodium, car l'épithélium n'est pas capable de transporter le calcium, ni le magnésium, aussi bien au repos qu'à l'état stimulé. Notons en passant que ces mêmes hormones (hormone antidiurétique, hormone parathyroïdienne et glucagon) inhibent la réabsorption des bicarbonates dans le segment médullaire de la branche large ascendante de l'anse de Henle [11]. L'insuline provoque, elle aussi, dans les deux segments médullaire et cortical, la même stimulation du transport du NaCl et des ions divalents que les hormones « cyclasiques », avec une cinétique tout aussi rapide, la réponse atteignant son plein développement en dix minutes environ [12]. L'insuline produit de l'AMP cyclique dans ces cellules, ce qui rend compte de la similitude de ses effets avec ceux des autres hormones qui agissent directement sur l'adénylate-cyclase. Cependant, on ignore encore le cheminement biochimique qui conduit ce récepteur, lui-même porteur d'une activité tyrosine-kinase [13], à produire ce second messager.
- Au total, jusqu'ici on a identifié chez la souris six hormones à récepteurs membranaires qui agissent sur la partie corticale de la branche large ascendante, dont quatre agissent aussi sur la partie médullaire. Curieusement, elles exercent toutes les mêmes effets physiologiques sur leurs cellules cibles communes. La question qui suit est alors immédiate: chacune de ces hormones est-elle capable, en l'absence des autres, d'exercer, au moins partiellement, un effet décelable sur la fonction intégrée de l'organe? Autrement dit, est-elle capable d'amplifier le pouvoir de concentration du rein et de réduire l'excrétion du magnésium?
- On constate que la suppression

Figure 5. Influence des hormones sur la pression osmotique du fluide à l'extrémité des anses de Henle des néphrons les plus longs et sur l'excrétion rénale du magnésium. **A :** A l'aide d'une micropipette de verre, un échantillon de fluide est prélevé sur l'animal in vivo à l'extrémité de l'anse de Henle des néphrons les plus longs. L'osmolalité atteinte à l'extrémité des anses de Henle de ces néphrons commande celle de l'urine émise par le rein. Chez l'animal « an hormonal » (HD), la pression osmotique est proche de celle du sang systémique (environ 300 mosmol.kg⁻¹ H₂O): le mécanisme de concentration est inefficace. L'administration intraveineuse de chacune des hormones qui stimule la réabsorption du sodium dans la branche large ascendante s'accompagne d'une augmentation de la concentration du fluide tubulaire. Chez le rat privé d'hormone antidiurétique circulante (diabète insipide, DI) mais ayant un taux habituel d'hormone parathyroïdienne, de calcitonine et de glucagon, la pression osmotique du fluide est plus élevée que lorsqu'une seule de ces hormones est présente. Chez ce rat, l'administration de dDAVP (un agoniste V_2 de l'hormone antidiurétique) produit une augmentation supplémentaire de la pression osmotique. Chacune de ces hormones est donc potentiellement capable d'agir sur la balance hydrique de l'organisme. **B :** Ces mêmes hormones sont capables d'influencer aussi l'excrétion du magnésium. Chez l'animal « an hormonal », le taux d'excrétion représente 15% à 25% de la quantité du magnésium filtré au niveau de l'ensemble des glomérules. L'administration intraveineuse de l'une quelconque des hormones qui stimulent la réabsorption du magnésium par la branche large ascendante s'accompagne d'une diminution importante de la quantité de magnésium excrétée par le rein. Ici l'excrétion du magnésium est exprimée par rapport au niveau atteint chez l'animal « an hormonal » (HD). Le glucagon ou la calcitonine administrés à des doses produisant individuellement une réduction maximale de l'excrétion rénale du magnésium ont des effets qui s'additionnent à ceux de l'hormone antidiurétique (elle-même administrée à dose maximale), alors que ceux de ces deux premières hormones ne s'additionnent pas entre eux. Cela suggère que l'hormone antidiurétique pourrait stimuler non seulement la voie de l'adénylate-cyclase, comme le font la calcitonine et le glucagon, mais aussi une seconde voie capable d'amplifier les effets résultant de la sollicitation de la première voie de transduction. Chacune de ces hormones est donc capable d'agir à la fois sur la balance hydrique et sur la balance du magnésium de l'organisme.



simultanée de quatre d'entre elles (hormone antidiurétique, hormone parathyroïdienne, calcitonine, glucagon) entraîne une abolition rapide et totale du gradient cortico-médullaire de pression osmotique. En leur absence, la pression osmotique du fluide à l'extrémité de l'anse de Henle des néphrons les plus longs, témoin de la concentration osmotique interstitielle (qui détermine la concentration de l'urine), chute et devient très proche de l'isotonicité (figure 5A). L'administration d'une seule de ces hormones augmente sensiblement la pression osmotique à la pointe de ces anses [14]. Chez des rats atteints de diabète insipide congénital résultant d'une mutation qui bloque la traduction de l'ARN messager de l'hormone antidiurétique, la présence des autres hormones permet le maintien d'un pouvoir de concentration non négligeable [15] (figure 5A). L'administration aiguë d'hormone antidiurétique accroît le pouvoir de concentration, qui redevient normal si l'on prolonge ce traitement au-delà d'une à deux semaines [16]. Chez le rat normal, les effets hydro-osmotiques de l'hormone antidiurétique sont d'ailleurs amplifiés par l'administration conjointe d'hormone parathyroïdienne [17] ou de glucagon [18]. Mais l'administration de chacune de ces hormones, aussi bien de façon aiguë (figure 5B) [7] que chronique [19], s'accompagne en même temps d'une diminution de l'excrétion du magnésium par le rein. Or un organe dont la fonction première est le maintien de la stabilité du milieu intérieur doit pouvoir excréter de façon différentielle chacun des éléments de ce milieu, indépendamment les uns des autres, en fonction des apports discontinus dans le temps, liés à la variété de l'alimentation et à la variabilité des apports hydriques. Comment le rein peut-il alors régler la balance hydrique et la balance du magnésium indépendamment l'une de l'autre, si chacune des hormones capables d'agir sur le segment tubulaire censé accomplir ces deux régulations exerce son effet simultanément sur le gradient de pression osmotique et sur la réabsorption du magnésium ?

La régulation différentielle des transports ioniques

Pour accomplir une fonction régulatrice, l'épithélium doit, en premier lieu, avoir la capacité de modifier le transport d'un ion, sans influencer le transport de l'autre. Il s'agit d'un

aspect capital du fonctionnement cellulaire. Qu'en est-il dans la branche large ascendante de l'anse de Henle? Dans cet épithélium, le transport du magnésium est essentiellement paracellulaire alors que le transport du sodium est à la fois paracellulaire et transcellulaire

(figure 6). Généralement, les hormones augmentent le transport transcellulaire du NaCl. Il en résulte une élévation de la différence de potentiel transépithéliale qui, à son tour, accroît le flux passif de réabsorption du Na⁺ et du Mg²⁺ à travers la voie paracellulaire, expliquant l'évolution parallèle des flux de Na⁺ et Mg²⁺. Toutefois, on connaît de nombreuses circonstances où le transport du Mg²⁺ peut être augmenté dans des proportions notables, alors que celui du Na⁺ n'est augmenté que dans une moindre proportion, voire non modifié du tout [20]. *In vitro*, lorsque le tubule vient d'être prélevé sur l'animal, le potentiel et le flux net de sodium sont élevés: l'addition d'hormone ne modifie ni l'un ni l'autre, mais amplifie le flux net de magnésium. Une telle dissociation s'observe aussi lorsque le fluide tubulaire est dilué par rapport au milieu périrubulaire, comme c'est d'ailleurs le cas *in vivo* pour ce segment du néphron. Lorsque la dilution atteint une valeur suffisante, la rétrodiffusion vers la lumière de Na⁺, *via* la voie paracellulaire, atteint une valeur qui égale celle du flux transcellulaire de cet ion, de telle sorte que le flux net transépithélial devient nul. L'addition d'hormone parathyroïdienne ou d'insuline, par exemple, ne change pas cette situation mais elle augmente d'une façon considérable le flux net de réabsorption de magnésium (figure 7). Dans ces deux exemples, l'ajout des hormones n'a en rien altéré la différence de potentiel transépithéliale, ce qui prouve qu'elles peuvent moduler sélectivement la perméabilité au Mg²⁺ de la voie paracellulaire, sans modifier le transport net de Na⁺. Comme cela a été évoqué dans le cas de l'épithélium intestinal [21], il est concevable que le Mg²⁺ fasse l'objet d'un transport facilité à travers la voie paracellulaire. La voie paracellulaire des épithéliums contient, en effet, des protéines, comme la cinguline ou la protéine ZO-1, dont la phosphorylation rendrait compte de l'augmentation de perméabilité [22]. Pour le moment, cependant, on n'a pas encore trouvé de situation dans laquelle le transport du Na⁺ pourrait être modulé indépendamment

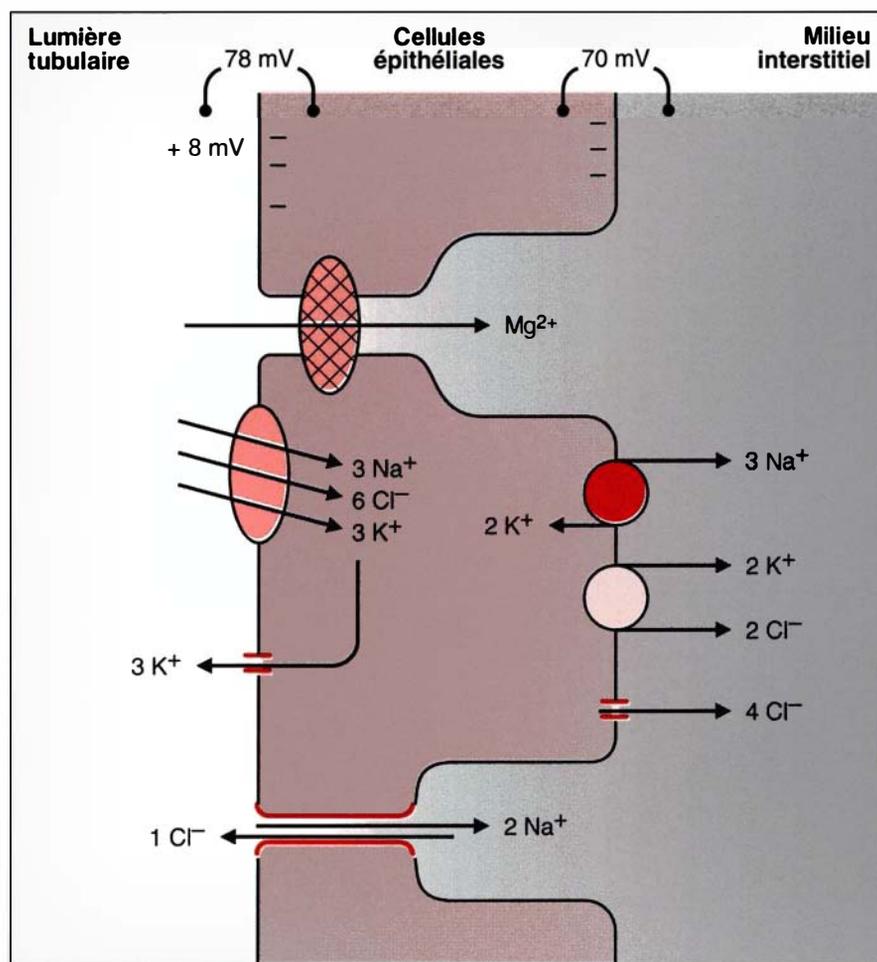


Figure 6. **Mécanismes des transports ioniques par l'épithélium de la branche large ascendante de l'anse de Henle.** L'épithélium est le siège de transports cellulaires et paracellulaires. Le NaCl, accompagné de K⁺, pénètre dans la cellule grâce à un transporteur Na2ClK électroneutre localisé dans la membrane apicale. C'est un gradient transmembranaire de sodium favorable, résultant de l'activité de la Na-K-ATPase basolatérale, qui crée l'énergie nécessaire au fonctionnement de ce transporteur. Le K⁺ qui pénètre dans la cellule, *via* le Na2ClK et la Na-K-ATPase, est évacué par un canal K⁺ apical et un transporteur basolatéral KCl électroneutre. Le chlorure en excès est évacué par un canal Cl⁻ basolatéral. La différence de potentiel transépithéliale, positive du côté apical par rapport au milieu basolatéral de référence, résulte exclusivement du courant créé par la sortie apicale des charges positives véhiculées par le K⁺ et la sortie basolatérale des charges négatives véhiculées par le Cl⁻. L'amplitude de la différence de potentiel est atténuée par l'effet de la voie de shunt (la voie paracellulaire) très perméable au sodium et, à un moindre degré, au chlore. Cette voie paracellulaire semble être la voie quasi exclusive du transport du magnésium. On pense à l'heure actuelle que certaines des protéines localisées dans les jonctions serrées des épithéliums pourraient faciliter le transport de cet ion divalent.

de celui du Mg^{2+} . Cela pourrait sans doute être observé dans des cas d'hypermagnésémie, une condition physiopathologique au cours de laquelle le transport de Mg^{2+} par l'anse de Henle est fortement inhibé [23].

Dans le cas de la branche large ascendante, la liaison de chacune des hormones à son récepteur spécifique entraîne donc individuellement la même réponse cellulaire. Mais on a vu que les cellules de ce segment pouvaient, suivant les circonstances, exprimer des réponses différentielles aux hormones. Pour la mise en œuvre d'une régulation hormonale selon un mode combinatoire, il est alors nécessaire que les hormones, ou du moins certaines d'entre elles, puissent agir simultanément sur les enzymes amplificatrices, afin de créer des situations dans lesquelles certaines composantes de la réponse seraient atténuées alors que d'autres seraient exaltées. On connaît de nombreux exemples d'action d'une même hormone sur deux enzymes amplificatrices d'une même population cellulaire, comme par exemple l'action de l'hormone parathyroïdienne sur le tubule proximal [24], ou de l'hormone antidiurétique sur les canaux collecteurs [25], en se limitant au rein. Ces situations existent très vraisemblablement dans la branche large ascendante. En effet, l'hormone antidiurétique est capable, du moins chez le lapin [26] et, à plus forte concentration, chez le rat [11], d'augmenter la concentration du calcium intracellulaire. On interprète actuellement ce fait comme le signe d'une action de l'hormone sur la phospholipase C. La calcitonine, ainsi que l'hormone parathyroïdienne, sembleraient pouvoir agir de même. De plus, les effets du glucagon et de la calcitonine sur le transport du Na^+ et du Mg^{2+} par ce segment du néphron ne sont pas additifs [27]. C'est le contraire pour le couple hormone antidiurétique-insuline. Ces deux hormones, utilisées individuellement à la concentration produisant un effet maximal sur les transports ioniques, ont des effets qui s'additionnent si on les fait agir simultanément [12]. En revanche, les prostaglandines réfrèrent les

effets du glucagon ou de l'hormone antidiurétique sur ces flux. On comprend mieux ces modulations si l'on admet que certaines de ces hormones agissent sur l'adénylate-cyclase, d'autres sur la phospholipase C, sans exclure, pour certaines d'entre elles une action simultanée sur les deux voies de transduction.

Un rôle capital pour les récepteurs

Mais les récepteurs eux-mêmes pourraient jouer un rôle majeur dans la mise en configuration de la cellule. Avec le développement d'une technique de RT-PCR quantitative, applicable aux segments de néphrons obtenus par microdissection [10], on s'aperçoit qu'une même cellule peut exprimer les messagers de plusieurs sous-types d'un même récepteur. Dans la branche large ascendante, c'est le cas, par exemple des deux sous-types de récepteurs de l'hormone antidiurétique (V_2S et V_2L) [28] ou des deux sous-types de récepteurs de l'insuline, chaque couple étant exprimé par épissage alternatif d'un même gène. Ces sous-types de récepteurs peuvent faire l'objet d'une expression différentielle d'un type cellulaire à l'autre. Ils pourraient aussi faire l'objet d'une expression différentielle dans une même cellule (figure 8), au cours de traitements hormonaux ou de variations des apports métaboliques liées à des modifications du régime alimentaire, par exemple. Les cellules lactotrophes offrent une bonne illustration de l'importance de ce phénomène. Ces cellules portent les deux isoformes d'un des récepteurs de la dopamine (le D_2 — on en identifie cinq répertoires de D_1 à D_5). Le rapport de l'expression des deux isoformes, différant d'un type cellulaire à l'autre, est sensible au taux des stéroïdes sexuels dans la circulation sanguine [29]. Or les deux isoformes, produites par épissage alternatif d'un même gène, diffèrent par un insert correspondant à une région de la molécule susceptible de se coupler aux protéines G. La modulation de l'expression de chacune des deux isoformes pourrait donc modifier la réponse cellulaire,

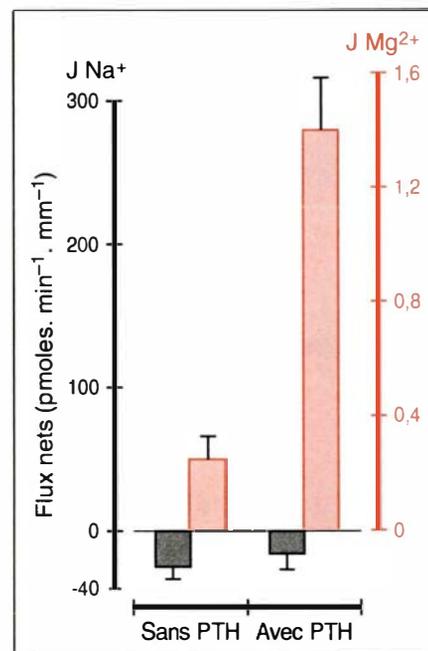


Figure 7. **Régulation différentielle des transports ioniques.** Un segment cortical de branche large ascendante de l'anse de Henle perfusé in vitro avec un fluide dilué (50 mM NaCl), alors que le bain est isoosmotique au plasma (150 mM NaCl), est le siège d'une différence de potentiel transépithéliale très élevée (+ 30 mV) en raison de la diffusion préférentielle du sodium (par rapport au chlore) du bain vers la lumière du tubule, à travers la voie paracellulaire. Dans de telles conditions, proches de celles existant in vivo dans les dernières centaines de microns de la branche large ascendante, le flux transcellulaire de réabsorption du Na^+ est voisin du flux paracellulaire de cet ion, dirigé en sens inverse, de sorte que le flux net global tend à s'annuler. En revanche, la différence de potentiel transépithéliale élevée maintient un flux de réabsorption soutenu de magnésium. L'addition d'hormone parathyroïdienne (PTH) (ou d'insuline) dans le bain ne modifie pas le transport de sodium, mais augmente de façon spectaculaire le transport du magnésium. Les hormones peuvent donc agir préférentiellement sur l'une des voies de transport de l'épithélium.

et donc l'activité lactotrophe, au cours du cycle sexuel ou à certaines périodes de la vie, comme pendant la gestation [30]. On retrouve une telle modulation de la fonction des récepteurs dopaminergiques dans les cellules de l'encéphale et de l'hypophyse, où les hormones sexuelles influencent l'épissage des ARNm du récepteur D_2 [31].

Un autre élément qui pourrait jouer un rôle dans une régulation pluri-hormonale est le phénomène de désensibilisation. On entend par là une réduction plus ou moins progressive de la réponse cellulaire, en rapport avec la durée de la liaison

de l'hormone sur son récepteur et le nombre des récepteurs impliqués. Il s'agit le plus souvent d'un découplage du complexe hormone-récepteur avec sa protéine G, qui peut s'accompagner d'une internalisation du récepteur, allant jusqu'à sa dégradation si la présence de l'hormone est suffisamment durable. Les différents types de récepteurs de la branche large ascendante peuvent se désensibiliser à leurs ligands spécifiques à des degrés divers (figure 8). La susceptibilité au phénomène de désensibilisation est la plus élevée pour les récepteurs V_2 de l'hormone antidiurétique et pratique-

ment nulle pour ceux de l'hormone parathyroïdienne et de la calcitonine, alors qu'elle est intermédiaire pour ceux du glucagon et pour les récepteurs β_1 adrénergiques [32]. Il semblerait, en outre, que cette susceptibilité puisse être différente selon les sous-types.

Un mode combinatoire de régulation

On saisit donc, au moins intuitivement, que ces phénomènes d'expression et de désensibilisation différentielle des récepteurs et de leurs sous-types pourraient être autant de facteurs qui permettraient à une régulation de s'exprimer dans une même cellule sur un mode combinatoire. Chaque réponse cellulaire serait associée à une configuration précise dans la membrane cellulaire des récepteurs sollicités. Chacun des types ou sous-types de récepteurs agissant ensuite sur des protéines G (G_s , G_i , G_p ...) activerait, à des degrés divers, le site de régulation de l'enzyme amplificatrice. Les hormones atteignant dans le sang systémique une concentration généralement très éloignée de celle qui engendre une réponse physiologique maximale de leurs cellules cibles, leurs actions sur chacune des voies de transduction pourraient s'additionner [18] et ce serait la résultante de toutes ces actions, dépendant du profil de distribution des hormones dans le sang, qui placerait l'épithélium dans tel ou tel mode de fonctionnement.

Un tel mode de régulation a déjà été postulé pour l'expression des gènes [33]. La transcription d'un gène est soumise au contrôle de nombreux facteurs activateurs ou répresseurs, qui agissent *in fine* sur une des trois ARN polymérases. Pour qu'une protéine participe à la formation d'un complexe activant l'une des polymérases, elle doit posséder la conformation requise non seulement pour déclencher une interaction avec les différents motifs régulateurs situés en amont du gène, mais encore pour s'associer, peut-être par certaines de ses faces, aux autres protéines régulatrices et/ou à une face particulière de la polymérase, structure multimérique

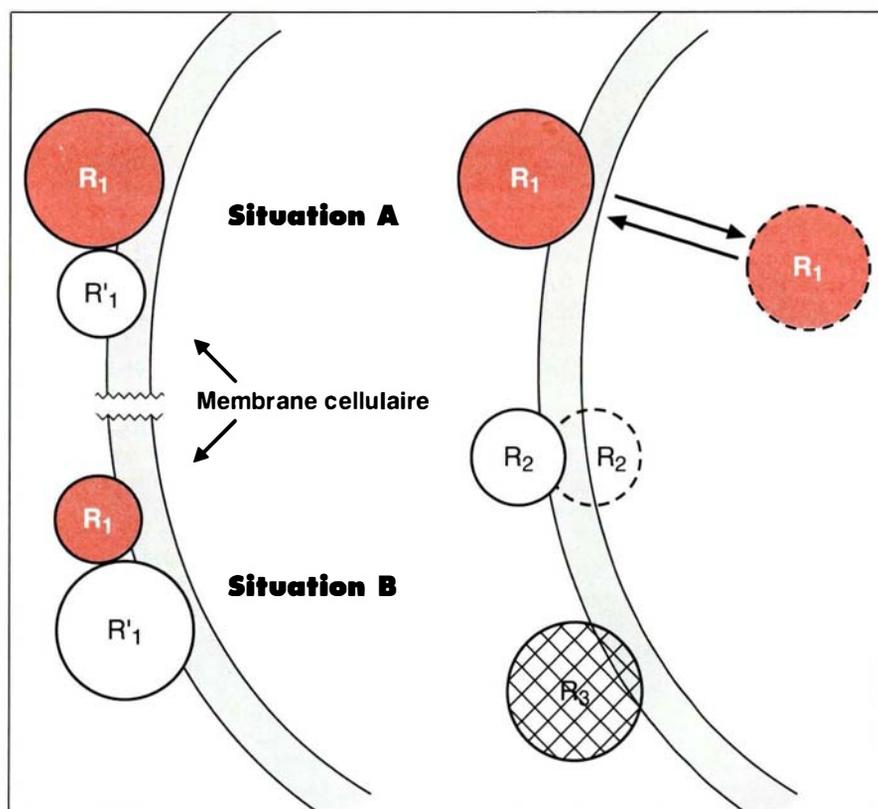


Figure 8. **Les récepteurs, facteurs de modulation majeurs de la réponse cellulaire.** En fonction de l'évolution des conditions physiologiques, liées au régime alimentaire, à l'état hormonal, à l'âge, etc., la densité des sous-types de récepteurs semble varier d'une situation à l'autre. Dans la situation A, l'expression du sous-type R_1 serait majoritaire par rapport à celle de R_1' , alors que dans la situation B ce serait l'inverse. En outre, l'état hormonal lui-même peut induire des phénomènes de désensibilisation, auxquels les différents types de récepteurs sont susceptibles à des degrés divers : R_1 subirait le processus, R_2 y serait modérément sensible, R_3 ne le serait pas du tout. Les sous-types d'un même récepteur pourraient aussi réagir différemment à ce phénomène, les uns par rapport aux autres. Les récepteurs étant les touches d'entrée des signaux hormonaux dans la cellule, on conçoit comment, dans un mode de régulation du type combinatoire, la distribution des récepteurs et de leurs sous-types à la surface de la membrane plasmique pourrait disposer la cellule dans une configuration lui conférant la capacité d'accomplir une fonction régulatrice précise.

composée de plus de dix sous-unités de tailles diverses. Une seule et unique combinaison de ces ensembles pourrait initier la transcription du gène, comme est assignée à chaque pièce d'un puzzle la position singulière [34]. Qu'il s'agisse des composants du milieu intérieur ou des gènes, dont le nombre est dans chaque cas considérable, on voit comment un mode combinatoire permettrait, à partir d'une variété limitée de molécules (hormones et facteurs d'expression), de placer les enzymes amplificatrices (adénylate-cyclase, phospholipases) ou transcriptionnelles (polymérase) dans un mode de fonctionnement précis, pour assurer une fonction unique : la régulation d'un des composants du milieu intérieur, ou la régulation de l'expression d'un gène.

Si une telle conception de la régulation pluri-hormonale de la composition du milieu intérieur s'avère correcte, il sera essentiel de nous orienter vers la recherche des mécanismes qui permettent à une cellule d'accomplir ces fonctions régulatrices indépendamment les unes des autres. Cela pourra être exploré, par exemple, en conditionnant préalablement les animaux par des régimes alimentaires appropriés : en réponse à une stimulation hormonale, le transport du magnésium par la branche large ascendante d'animaux ayant subi un régime carencé en magnésium [35] devrait être considérablement amplifié par rapport à celui du sodium. La mesure quantitative des sous-types de récepteurs exprimés au cours de telles variations des apports métaboliques, ou à la suite d'épreuves de « désensibilisation », ou encore au cours du vieillissement cellulaire, couplée au suivi du calcium intracellulaire lié à la voie de la phospholipase, ou de l'AMP cyclique lié à la voie de l'adénylate-cyclase, devrait nous permettre de préciser les voies de transduction mises en jeu au cours de ces différentes situations, et d'assigner, *in fine*, un rôle physiologique à chacun de ces sous-types. Enfin, l'application de « cocktails » hormonaux sur des branches larges ascendantes microperfusées *in vitro* devrait révéler les combinaisons qui favorisent la dissociation des trans-

ports ioniques, et notamment de ceux qui empruntent la voie transcellulaire par rapport à ceux qui transitent par la voie paracellulaire. Cependant, comme le néphron est composé d'une succession de segments tubulaires capables de transporter la plupart des éléments filtrés, il sera nécessaire, au-delà du niveau cellulaire, d'atteindre un niveau d'intégration « segmentaire » vis-à-vis de tel ou tel constituant du milieu intérieur si l'on veut comprendre la fonction régulatrice du rein dans son ensemble ■

Remerciements

L'auteur exprime ses remerciements les plus chaleureux à F. Morel ainsi qu'à C. Amiel, L. Bankir, J.P. Bonvalet, D. Chabardès, A. Doucet, R. Greger, M. Imbert-Teboul, N. Roinel et A. Sentenac pour leurs conseils amicaux, et toute sa reconnaissance à C. Bailly, J.M. Bulher, B. Corman, A. di Stefano, I. Dublineau, J.M. Elalouf, B. Mandon, E. Siga et M. Wittner qui ont contribué aux travaux évoqués dans cet article, ainsi qu'à N. Anmella pour son assistance dans la préparation de ce manuscrit.

La vasopressine, le glucagon, la calcitonine et l'hormone parathyroïdienne agissent sur le système adénylate-cyclasique de la branche large ascendante où elles induisent une production intracellulaire d'AMP cyclique. Puisque l'AMP cyclique est responsable du déclenchement de la réponse physiologique de la cellule, chacune de ces hormones doit donc produire le même effet final. Dès lors, pour rechercher in vivo les propriétés physiologiques d'une de ces hormones, il est nécessaire non seulement de la retirer du sang circulant, puis d'en rétablir la présence selon le protocole habituellement adopté, mais il faut aussi supprimer celles qui sont susceptibles d'en masquer les effets par le maintien qu'elles exercent sur l'activité de l'enzyme. Pour cela, un modèle dit « an hormonal » (faute de meilleure terminologie) a été utilisé. Il s'agit d'un animal chez lequel les processus de sécrétion de chacune de ces quatre hormones sont expérimentalement interrompus, soit par ablation de la glande, soit par inhibition physiologique ou pharmacologique [8].

Summary

Is the multi-hormonal regulation of the kidney cell functions achieved through a combinatorial mode ?

The kidney is the main organ regulating the composition of the body fluids. A considerable number of hormones controls the activity of the renal cells to maintain the equilibrium of the hydromineral balance. It becomes more and more difficult to interpret this multi-hormonal control in terms of regulatory processes. For illustrating this complexity, the hormonal regulation of the electrolyte transport in the nephron thick ascending limb is taken as an example. This nephron segment is very directly responsible for two kidney functions: the urinary concentrating ability (by its capacity to transport hypertonic sodium chloride) and the regulation of magnesium excretion into final urine. Six hormones are presently identified as acting on the transport of both NaCl and Mg²⁺ in this nephron segment. The question is therefore to determine how the thick ascending limb and, hence, the kidney, is capable of regulating the water balance independently from the magnesium balance. It is proposed that the hormones act in a combinatorial mode: the circulating levels of each of the hormones acting on these cells would settle the configuration of the paracellular and transcellular transport pathways of the epithelium either in the « sodium » or « magnesium » mode. The configuration would depend on the distribution of the receptor isoforms at the surface of the basolateral membrane; this distribution may vary according to factors such as age, nutritional variability, hormonal status, degree of desensitization of the receptors, etc. The modulation of the hormonal responses would depend on the degree of coupling of the hormone-receptor complexes to the different intracellular transduction pathways and on the resulting negative and/or positive interactions between these pathways.