m/s SYNTHÈSE

médecine/sciences 1986; 2 : 422-8

Transport du phosphore inorganique par le tubule proximal du rein

Le phosphate présent dans le tubule proximal du rein est réabsorbé contre un gradient électrochimique, ce qui implique l'intervention de systèmes de transport actifs dont les mécanismes commencent seulement à être connus.

Michèle G. Brunette
Professeur titulaire, département de pédiatrie, université de Montréal.

La plus grande partie de la réabsorption rénale du phosphate inorganique (PO_4) a lieu dans le tubule proximal, qui est donc le site d'action principal, sinon unique, des facteurs régulateurs de la phosphaturie. La concentration du liquide tubulaire en PO_4 étant de 60 % de celle du plasma dans la partie moyenne du tubule proximal, et le potentiel électrique étant seulement d'environ +1 mV dans ce segment alors que le potentiel intra-cellulaire est très négatif, le transport du PO_4 se fait contre un gradient électrochimique et implique donc des mécanismes actifs. Au cours de ce processus, le PO_4 a trois étapes cellulaires à franchir : la bordure en brosse, le cytosol et la membrane basolatérale. Le gradient électrochimique étant essentiellement situé de part et d'autre de la bordure en brosse, il est compréhensible que les mécanismes impliqués dans le transport du PO_4 par cette membrane aient fait l'objet de nombreux travaux. La bordure en brosse possède, comme nous le verrons, tous les éléments nécessaires pour transporter le PO_4 mais ceux-ci sont influencés par le métabolisme intra-cellulaire ainsi que par de nombreux facteurs extérieurs à la cellule *(figure 1)*.

La bordure en brosse

Le transport du PO_4 par la membrane de la bordure en brosse (MBB) est un mécanisme actif. In vivo, le transport du PO_4 par la MBB se fait contre un gradient électrochimique. La concentration du PO_4 inorganique libre à l'intérieur de la cellule, telle que déterminée par résonance magnétique nucléaire [1], est semblable à celle du phosphore intraluminal, mais le potentiel électrique (V) à l'intérieur de la cellule est très négatif par rapport à celui de la lumière tubulaire et impose un gradient défavorable à l'entrée du PO_4. Cette hypothèse d'un transport actif fut confirmée par les études sur des préparations de membranes in vitro : l'accumulation de PO_4 en fonction du temps par les vésicules de MBB ne contenant pas de sodium, incubées dans un milieu contenant du Na et du phosphate, montre une entrée initiale très rapide du PO_4, atteignant une accumulation maximale entre 30 secondes et 2 minutes selon la température de l'incubation. Ce pic de PO_4 intra-vésiculaire témoigne d'un mécanisme de transport du PO_4 couplé à celui du sodium. Le transport initial augmente avec la concentration de phosphate dans le milieu jusqu'à ce que soit atteint un niveau de saturation, suivant les lois de Michaelis Menten.

Un ou deux systèmes de transport ? A des concentrations relativement faibles de PO_4 (0,04 à 0,1 mM), les valeurs de Km (constante de Michaelis Menten) et Vmax (vitesse initiale maximale) sont de 80 µM PO_4 et 5 nmoles/10 $sec^{-1}.mg^{-1}$ protéines respectivement [2, 3]. Cependant, avec des concentrations plus élevées de PO_4,

RÉFÉRENCES

1. Freeman D, Bartlett S, Radda G, Ross B. Energetic of Na transport in the kidney saturation transfer. *Biochem Biophys Acta* 1983; 762 : 325-36.

2. Kinne R, Berne RW, Hoffmann N, Murer H. Phosphate transport by isolated renal and intestinal plasma membranes. *Adv Exp Med Biol* 1977; 81 : 265-77.

3. Brunette MG, Béliveau R, Chan M. Effect of temperature and pH on phosphate transport through brush border membrane vesicles in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1984a; 62 : 229-34.

4. Brunette MG, Chan M, Maag U, Béliveau R. Phosphate uptake by superficial and deep nephron brush border membranes. Effect of dietary phosphate and parathyroid hormone. *Pflugers Arch* 1984b; 400 : 356-62.

5. Baumann K, De Rouffignac C, Roinel N, Rumrich G, Ullrich KJ. Renal phosphate transport: inhomogeneity of local proximal transport rates and sodium dependence. *Pflugers Arch* 1975; 356 : 287-97.

6. Dennis VW, Woodhall PB, Robinson RR. Characteristics of phosphate transport in isolated proximal tubule. *Am J Physiol* 1976; 231: 979-85.

7. Brunette MG, El Mernissi G, Doucet A. Na uptake by renal brush border membrane and Na-K ATPase activity along the nephron in genetic hypophosphatemic mice. *Can J Physiol Pharmacol* 1985 (sous presse).

ADRESSE

M. G. Brunette : Département de Pédiatrie, hôpital Maisonneuve, 5415, boulevard de l'Assomption, H1T 2M4, Montréal.

une deuxième composante de transport apparaît, dont la vitesse maximale est supérieure, et l'affinité inférieure, aux valeurs correspondantes du premier système. Ainsi, lorsque le transport du PO_4 est étudié en utilisant une large gamme de concentrations et que les valeurs obtenues sont figurées selon la méthode de Eadie-Hofstee (vitesse en fonction de vitesse/substrat), on observe une courbe brisée qui se décompose en deux constituantes dont les Km respectifs sont 70 µM et 1,18 mM [3]. Cette dualité de systèmes de transport cependant n'est mise en évidence qu'à des températures d'incubation supérieures à 20-25°C, et avec des vésicules provenant du cortex superficiel. Le cortex profond, du moins chez le rat, ne semble posséder que le système de transport à haute affinité [4].

Le rôle du sodium

L'énergie nécessaire au transport du PO_4 par la cellule du tubule proximal, et particulièrement par la MBB, provient du gradient électrochimique de sodium. Si l'on abaisse le gradient extra-intracellulaire de sodium dans des expériences de microperfusion in vivo [5], ou de microperfusion de tubule isolé in vitro [6], le transport de PO_4 est immédiatement inhibé. De la même façon, nous l'avons vu, l'entrée du PO_4 dans les vésicules de MBB préparées in vitro dépend largement du gradient de sodium. Le sodium influence la cinétique du transport de PO_4 en changeant l'affinité de la molécule transporteuse pour le PO_4 : plus le sodium dans le milieu d'incubation est élevé, plus l'affinité pour le PO_4 augmente [7]. Mais le transport du PO_4 dépend aussi de l'affinité du système pour le sodium, et cette

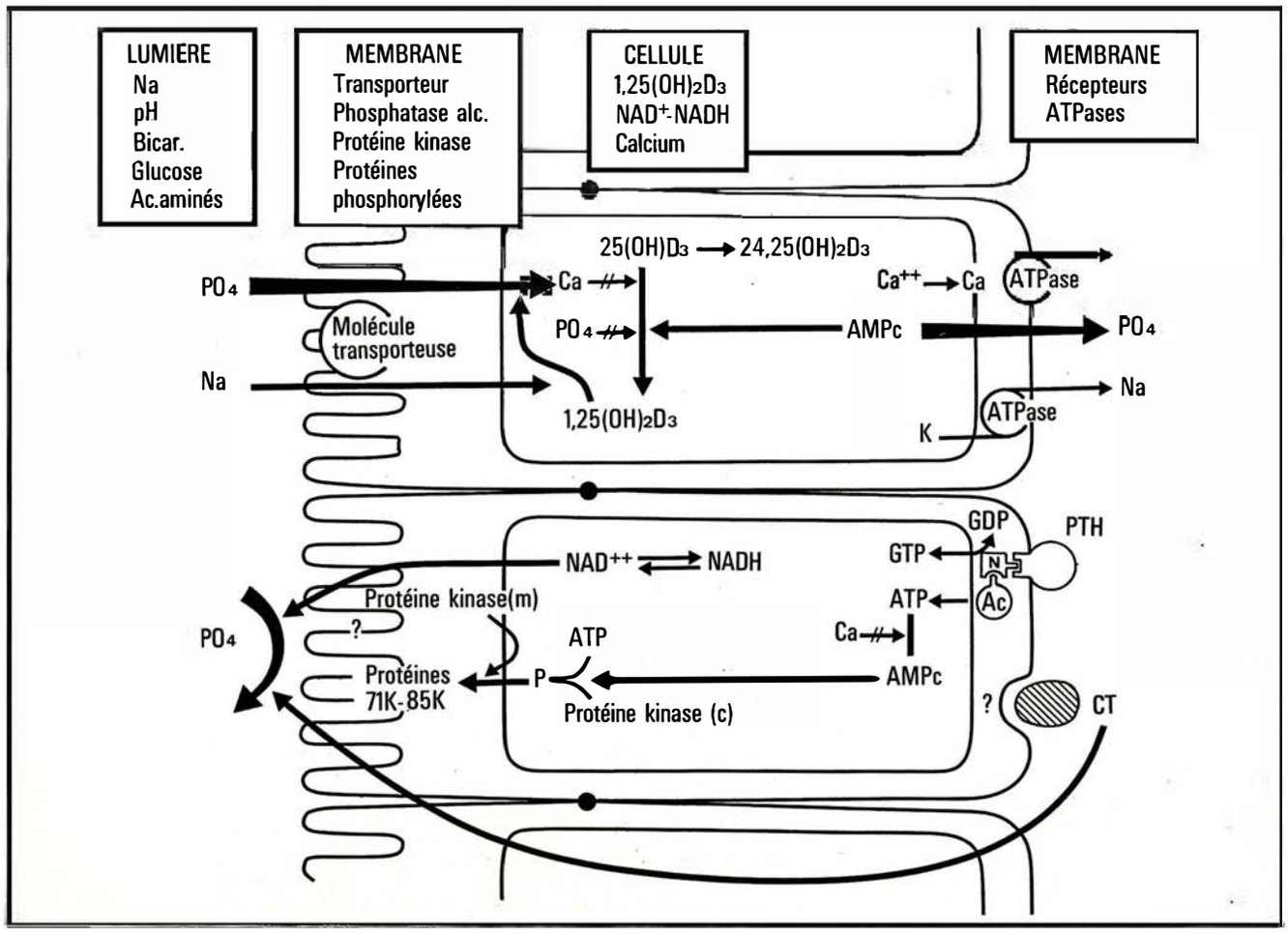

Figure 1. ***Représentation schématique des mécanismes impliqués dans le transport du phosphore inorganique par la cellule du tubule proximal.*** *Les facteurs sont répartis en quatre catégories selon leur situation topographique : lumière tubulaire, membrane luminale, milieu intracellulaire, et membrane basolatérale. Les flèches indiquent soit le mouvement des substrats, soit la direction des réactions chimiques. Les flèches barrées (⇸) indiquent que la substance a une action inhibitrice sur la réaction en question.*
Ac = adénylate cyclase; CT = calcitonine; (m) : membranaire; (c) : cytosolique; N = protéine N; GTP = guanosine triphosphate; GDP = guanosine diphosphate.

RÉFÉRENCES

8. Amstutz M, Mohrmann M, Gmaj P, Murer H. Effect of pH on phosphate transport in rat renal brush border membrane vesicles. *Am J Physiol* 1985; 248: F 705-10.

9. Cheng L, Sacktor B. Sodium gradient dependent phosphate transport in renal brush border membrane vesicles. *J Biol Chem* 1981; 256: 1556-64.

10. Sacktor B, Cheng L. Sodium gradient dependent phosphate transport in renal brush border membrane vesicles. Effect of an intravesicular extravesicular proton gradient. *J Biol Chem* 1981; 256: 8080-4.

11. Hoffman N, Thees M, Kinne R. Phosphate transport by isolated renal brush border vesicles. *Pflugers Arch*, 1976; 362: 147-56.

12. Burckhardt G, Stern H, Murer H. The influence of pH on phosphate transport into rat renal brush border membranes vesicles. *Pflugers Arch* 1981; 390: 191-7.

13. Plante GE, Petitclerc C, Nawar T, Erian R. Increased phosphaturia during inhibition of renal alkaline phosphatase. *Miner Electrolyte Metab* 1979; 2: 258.

14. Brunette MG, Dennis VW. Effect of L-bromotetramisole on phosphate transport by the proximal renal tubule: Failure to demonstrate a direct involvement of alkaline phosphatase. *Can J Physiol Pharmacol* 1982; 60: 276-81.

15. Yusufi ANK, Low MG, Turner ST, Dousa TP. Enzymatic removal of alkaline phosphatase from renal brush border membrane: Effect on Na^+-dependent transport of phosphate. *The American Society of Nephrology, 16th annual meeting* 1983; abstract: 21A.

16. Brunette MG, Chan M, Lebrun M. Phosphatase activity along the nephron of mice with hypophosphatemic vitamin D resistant rickets. *Kidney Int* 1981; 20: 181-7.

17. Kinne R, Shlatz LV, Kinne-Saffran E, Schwartz IL. Distribution of membrane bound cyclic AMP dependent protein kinase in plasma membranes of cells of the kidney cortex. *J. Membr Biol* 1975; 24: 145-59.

18. Hammerman MR, Hansen VA, Morrissey JJ. Cyclic AMP-dependent protein phosphorylation and dephosphorylation alter phosphate transport in canine renal brush border vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1983; 755 : 10-6.

19. Brunette MG, Allard S. Renal brush border membrane phosphorylation: influence of PTH status and dietary phosphate on the intrinsic protein kinase activity. *Can J Physiol Pharmacol* 1985; 63 (sous presse).

20. Kessler RJ, Fanestil DD. Identification of a phosphate binding proteolipid in kidney brush border. In: Bronner F, Peterlik M, eds. *Calcium and Phosphate Transport Across Biomembranes.* New York; Academic Press, 1981: 123-6.

dernière est elle-même modifiée par le pH : en milieu acide, cette affinité baisse [8].

Le transport du PO_4 dépend du pH. Théoriquement le pH est susceptible d'influencer le transport du PO_4 de deux façons : d'une part, en modifiant la concentration respective des formes mono et divalentes de l'ion phosphate et d'autre part, en agissant directement sur la molécule transporteuse. Les études effectuées sur vésicules mesurent le transport du PO_4 total. Il n'est pas possible d'étudier directement avec cette technique le transport de chacune des formes séparément (en dehors de pH extrêmes). Des arguments indirects cependant suggèrent que c'est la forme divalente qui est transportée. En effet, quel que soit le pH, l'inverse du transport de PO_4 est en relation directe avec l'inverse du carré de la concentration en sodium, comme si deux molécules de sodium accompagnaient une molécule de PO_4. Par ailleurs, Cheng et Sacktor [9] ont incubé des vésicules dans des milieux à pH variables mais composés de telle sorte que les formes mono ou divalentes demeurent constantes. Lorsque les monophosphates sont constants et que les diphosphates augmentent (donc le pH aussi), le transport total augmente. Cependant, lorsque les diphosphates restent constants, et que le pH augmente, le transport augmente quand même. Il semble donc que, non seulement la forme divalente est préférentiellement transportée, mais qu'un pH relativement alcalin stimule en soi le transporteur.

Récemment, nous avons confirmé cet effet en étudiant les cinétiques de transport du PO_4 par des MBB à différents pH. Nous avons trouvé que l'augmentation du pH abaisse la Km du système à forte affinité. Si nos données sont analysées en utilisant l'hypothèse que seule la forme divalente du phosphate est transportée, les cinétiques se réorganisent pour ne donner qu'une seule Km et plusieurs Vmax, comme si la forme divalente était transportée avec une même affinité quel que soit le pH, mais que ce dernier influençait directement la Vmax du transporteur [3]. Dans cette étude, le pH optimum était de 7,5.

Enfin, le pH à l'intérieur des vésicules semble aussi avoir de l'importance : un pH acide, dans des conditions d'équilibre de sodium (sodium intérieur = sodium extérieur) semble favoriser le transport de PO_4 [10].

Le transport du PO_4 est-il ou n'est-il pas électrogénique ? Dans leur première étude sur les MBB, Hoffman *et coll.* [11] ont étudié l'effet positif du NaCl dans le milieu d'incubation sur le transport de PO_4 et ils en ont conclu que le gradient de NaCl entraînait un potentiel de membrane négatif à l'intérieur des vésicules. Le remplacement de l'ion Cl^- par des ions SCN^- plus diffusibles, ou par du cyclamate qui dépolarise la membrane, accentue et décroît respectivement le transport, confirmant cette hypothèse. Il semble donc qu'une certaine partie du mouvement du PO_4 à travers la membrane s'accompagne d'un transport de charges positives. Hoffman suggérait alors que ce transport de charges pouvait être dû au transport du PO_4 monovalent avec 2 Na^+. En 1981, Burckhardt *et coll.* [12] reprennent cette idée et étudient le changement du potentiel électrique intravésiculaire lors du transport de PO_4, à l'aide d'indicateurs fluorescents. Lorsque du PO_4 est ajouté au milieu d'incubation, ils observent une différence de potentiel électrique positif à l'intérieur des vésicules, comme si deux ions Na étaient transportés tant avec les formes monovalentes que divalentes de PO_4. Pourtant, l'induction d'un potentiel intravésiculaire négatif par le truchement d'un potentiel de diffusion de potassium (intérieur > extérieur) induit par de la valinomycine [12] ou d'un potentiel de diffusion de protons [9, 10], n'influence pas le transport du PO_4. On ne sait donc pas encore de façon certaine si ce transport est électrogénique ou non.

Le rôle de la phosphatase alcaline dans le transport du PO_4 par la MBB est obscur. Il a été proposé que la phosphatase, une enzyme largement présente dans les MBB, joue un rôle important dans le transport du PO_4. La perfusion in vivo de lévamisole, un inhibiteur spécifique de cette enzyme, dans l'artère rénale entraîne une phos-

phaturie du même côté [13]. Cependant, il fut difficile d'établir une corrélation étroite entre transport de PO_4 par la MBB et son contenu en phosphatase alcaline. L'inhibition de l'activité de l'enzyme par un analogue du lévamisole, le tétramisole, ne change pas le transport de PO_4 par des vésicules de MBB [14]. De plus, des expériences qui consistent à enlever l'enzyme de la membrane par des procédés chimiques réussirent à démontrer que l'intégrité du transport n'était pas liée à la présence de la phosphatase alcaline [15]. Il reste tout de même vrai que cette enzyme est localisée très précisément dans le segment du néphron qui transporte le phosphore, particulièrement là où ce transport est maximal, c'est-à-dire au début du tubule proximal, et qu'elle est abaissée dans la maladie génétique dont le principal trait est un défaut de transport du PO_4 [16]. Le substrat naturel de la phosphatase alcaline est inconnu. Son identification pourrait éventuellement aider à comprendre le rôle de cette enzyme mystérieuse dont le pH optimal d'activité est loin d'être physiologique.

La MBB une fois séparée de la cellule, se souvient des activités de transport qu'elle avait in vivo.

Les vésicules de MBB provenant d'animaux ayant été carencés en PO_4, parathyroïdectomisés ou surchargés en hormone de croissance, ont une capacité accrue de transport de PO_4, en comparaison de celles des animaux témoins et inversement dans les situations opposées. On ignore la nature des changements responsables de cette « mémoire membranaire ». Comme certains de ces facteurs agissent très rapidement, en moins d'une heure, il est probable qu'ils ne modifient pas la synthèse du transporteur, mais plutôt qu'ils changent topographiquement ou biochimiquement la disponibilité des molécules transporteuses existantes dans la membrane.

On sait depuis longtemps que l'action phosphaturique de l'hormone parathyroïdienne s'accompagne in vivo d'une phosphorylation de certaines protéines de la MBB [17]. Cette phosphorylation implique l'AMP cyclique formé sous la dépendance de l'hormone ainsi que des protéines kinases dont une au moins est située dans la membrane elle-même. La déphosphorylation se fait par une phosphatase, elle aussi située dans la membrane. La phosphorylation in vitro de la MBB avec de l'ATP exogène et la protéine kinase endogène s'accompagne d'une baisse de transport de PO_4 par les vésicules correspondantes. Inversement, la déphosphorylation de cette même membrane rétablit le transport [18]. Ces observations suggèrent, sans le prouver, l'existence d'un lien direct entre phosphorylation membranaire et transport du PO_4. Cependant, on ne sait pas si cette phosphorylation est responsable du phénomène de « mémoire membranaire » induit par l'action de l'hormone parathyroïdienne, et encore moins si elle intervient dans les modifications de la MBB liées au contenu du régime alimentaire en PO_4.

Afin de vérifier de façon indirecte si l'hormone parathyroïdienne et le régime modifient la MBB de façon analogue, nous avons étudié la capacité des protéines membranaires à être phosphorylées in vitro par la protéine kinase de la membrane elle-même chez des animaux dans différentes conditions diététiques et hormonales. Nous avons mis en évidence au moins deux protéines (Mr = 71 K et 84 K) dont la phosphorylation in vitro est dépendante de l'AMP cyclique. Aucun des états physiologiques étudiés n'influence de façon significative la phosphorylation maximale des deux protéines en question : la Vmax de cette phosphorylation, lorsque diverses concentrations d'ATP sont utilisées, est tout à fait semblable chez tous les animaux, indépendamment du régime ou de l'activité de l'hormone parathyroïdienne (PTH) [19].

Mais quelle est cette molécule transporteuse ? Les bases moléculaires du transport du PO_4 demeurent inconnues. Les études qui ont cherché à les identifier se sont heurtées à l'absence de marqueur spécifique. Alors que la molécule qui transporte le glucose lie de façon compétitive la phlorizine, aucune substance connue ne se lie de façon semblable au transporteur de phosphore. En revanche, plusieurs protéines de la MBB lient le PO_4 avec une grande affinité. En dehors de la phosphatase alcaline qui, comme nous l'avons vu, ne semble pas jouer un rôle déterminant dans le transport du PO_4, Kessler et Fanestil [20] ont décrit et isolé à partir de MBB de rein de lapin un protéolipide, la phosphorine, qui lie le PO_4 inorganique de façon spécifique et avec une forte affinité. Cette liaison est inhibée par certains inhibiteurs du transport de PO_4, et elle est influencée par la présence d'EDTA, comme l'est, dans une certaine mesure, le transport de PO_4 [21]. Ces auteurs suggèrent que ce protéolipide est impliqué dans le transport de PO_4.

Le cytosol

Nos connaissances sur le sort du PO_4 au cours de son transport intracellulaire sont très restreintes.

Concentration cytosolique de phosphates. La concentration de phosphore inorganique dans la cellule a été évaluée, entre autre, par résonance magnétique nucléaire. Freeman *et coll.* [1] rapportent des valeurs de 2,4 µmol/gm de tissu, ce qui revient approximativement à 1 mmol/litre d'eau intracellulaire. Le PO_4 intramitochondrial n'étant probablement pas détecté par la technique de résonance magnétique à cause de la forte densité de la mitochondrie, il s'agit donc de la concentration cytosolique approximative.

Échange mitochondrial. Une fois entré dans la cellule, le PO_4 inorganique est en échange constant avec le PO_4 organique, et particulièrement avec les composés phosphorylés à haute énergie (ATP-ADP). Il est aussi transporté par les membranes mitochondriales de façon active, selon deux systèmes, l'un assurant un cotransport phosphore$^-$/proton$^+$, l'autre assurant l'échange phosphore^{2-}/dicarboxylate^{2-} [22].

Le transport du PO_4 par la membrane de la mitochondrie est intimement lié au métabolisme de celle-ci. Si des tubules isolés sont perfusés dès le début de leur préparation avec un perfusat ne contenant pas de PO_4, une réduction du transport

RÉFÉRENCES

21. Kessler RJ, Vaughn DA. Divalent metal is required for both phosphate transport and phosphate binding to phosphorin, a proteolipid isolated from brush border membrane vesicles. *J Biol Chem* 1984; 259: 9059-63.

22. Pedersen PL, Wehrle JP. Phosphate transport processes of animal cells. In: Martonosi A, ed. *Membrane and Transport, volume 1*. New York: Plenum Press, 1982: 645-63.

23. Dennis VW, Brazy PC. Divalent anion transport in isolated renal tubules. *Kidney Int* 1982; 22: 498-506.

24. Gullans SR, Brazy PC, Dennis VW, Mandel LJ. Metabolic inhibitors: effects on metabolism and transport in the proximal tube. *Am J Physiol* 1982; 243: F 133-40.

25. Braun-Werness JL, Jackson BA, Werness PG, Dousa TP. Binding of nicotinamide adenine dinucleotide by the renal brush border membrane from rat kidney cortex. *Biochim Biophys Acta* 1983; 732: 553-61.

26. Kempson SA, Colon-Otero G, Lise-Ou SY, Turner ST. Possible role of nicotinamide adenosine dinucleotide as an intracellular regulator or renal transport of phosphate in the rat. *J Clin Invest* 1981; 67: 1347-60.

27. Lavender AR, Pullman TN. Changes in inorganic phosphate excretion induced by renal arterial infusion of calcium. *Am J Physiol* 1963; 205: 1025-32.

28. Oberleithner H, Lang F, Greger R, Sporer H. Influence of calcium and ionophore 23187 on tubular phosphate reabsorption. *Pflugers Arch* 1979; 379: 37-41.

29. Ullrich KJ, Rumrich G, Klöss S. Phosphate transport in the proximal convolution of the rat kidney. II Effect of extracellular Ca^{2+} and application of the Ca^{2+} ionophore A 23187 in chronic PTX animals. *Pflugers Arch* 1978; 377: 33-42.

30. Brunette MG, Chan M, Ferrière C, Roberts KD. Site of $1,25(OH)_2$ vitamin D_3 synthesis in the kidney. *Nature* 1978; 276: 287-9.

31. Gekle D, Stroder J, Rostoc K. The effect of vitamin D on renal inorganic phosphate reabsorption of normal rats, parathyroidectomized rats and rats with rickets: *Pediatr Res* 1971; 5: 40-52.

32. Tsutsumi M, Alvarez U, Avioli LV, Hruska KA. Effect of 1,25 dihydroxyvitamin D_3 on phospholipid composition of rat renal brush border membrane. *Am J Physiol* 1983; 249: F 117-23.

33. Schwab JJ, Klahr S, Hammerman MR. Na^+ gradient dependent Pi uptake in basolateral membrane vesicles from dog kidney. *Am J Physiol* 1984; 246: F 663-9.

34. Robdell M, Birnbaumer L, Pohl SL, Kraus HMJ. The glucagon-sensitive adenyl cyclase system in plasma membrane of rat liver. V. An obligatory role of guanyl nucleotides in glucagon action. *J Biol Chem* 1971; 250: 5826-34.

de sodium par la cellule entière est observée. Cet effet fut attribué au fait que l'entrée de plusieurs substrats dans la mitochondrie est dépendante du PO_4 [23]. Privée de substrats, la mitochondrie n'assume plus adéquatement ses fonctions métaboliques et énergétiques. De façon analogue, la réduction progressive du métabolisme de la mitochondrie par des agents découplants tels que le CCCP (m-chroro-carbonyl-cyanide phényl-hydrazone) ou bien par des inhibiteurs de transport d'électrons (roténone) entraîne une baisse proportionnelle du transport du sodium et du PO_4, alors que celui du glucose est moins influencé par cette manœuvre. Parallèlement, on observe une réduction de l'ATP intracellulaire [24]. Il semble donc que si le PO_4 intracellulaire joue un rôle important dans le métabolisme de la mitochondrie, ce dernier influence aussi la réabsorption du sodium et du PO_4. Il est donc tout à fait concevable qu'une anomalie, soit du transport au niveau de la membrane mitochondriale, soit du métabolisme de la mitochondrie elle-même, aboutisse finalement à une phosphaturie anormale.

Influence du NAD^+. Parmi les autres facteurs intracellulaires exerçant une influence sur le transport du PO_4, le NAD^+ s'est vu attribuer, ces dernières années, un rôle important. Le NAD^+ est un nucléotide servant de coenzyme à plusieurs déshydrogénases dans de nombreuses réactions d'oxydoréduction du métabolisme intermédiaire. De plus, le NAD^+ est relié à la ribolysation de protéines membranaires par l'ADP. Kempson, Dousa et leurs collaborateurs ont testé l'hypothèse que le niveau cytosolique de NAD^+ influence directement le transport du PO_4 par la MBB. Ils ont rapporté que le NAD se liait de façon spécifique sur la MBB à deux sites d'affinité différente [25]. De plus, l'injection de nicotinamide chez le rat entraîne parallèlement une augmentation du contenu en NAD^+ dans le cortex rénal, une augmentation de la phosphaturie et une diminution du transport de PO_4 par les MBB de ces animaux [26]. Il se peut donc que le NAD^+, dont la concentration varie avec les états nutritionnels et hormonaux, joue un rôle de messager important dans la régulation de la phosphaturie.

Le calcium intracellulaire. Le calcium intracellulaire et extracellulaire joue probablement un rôle important, quoique mal défini, dans le transport du PO_4. La perfusion dans une artère rénale d'une solution riche en calcium stimule la réabsorption du phosphore du même côté [27]. De même, l'application d'une solution riche en calcium sur la surface du rein [28] ou dans le capillaire péritubulaire [29] augmente le transport du PO_4 par les tubules sous-jacents. Enfin, la microperfusion de l'ionophore 23187, qui accroît la perméabilité des membranes cellulaires au calcium, stimule la réabsorption du PO_4 par le tubule microperfusé [28]. Le calcium libre pourrait intervenir dans le transport du PO_4 par son action antagoniste de l'adénylate cyclase responsable de la formation d'AMP cyclique.

Enfin, la cellule du tubule proximal est le site de synthèse de la $1,25(OH)_2$ vitamine D_3 [30]. Lorsque la vitamine D ou ses métabolites sont administrés à un rat de façon aiguë, ils augmentent la réabsorption du PO_4 filtré [31]. Comme l'administration de 25 OH vitamine D_3 s'accompagne d'une baisse d'excrétion de l'AMP cyclique et que le calcium intracellulaire inhibe l'adénylate cyclase, l'hypothèse a été émise que l'action antiphosphaturique de la $1,25(OH)_2$ D_3 s'effectue par une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire. Il demeure aussi possible que cette hormone modifie le transport du PO_4 en changeant la composition en phospholipides de la MBB [32].

La membrane basolatérale

La concentration intracellulaire de PO_4 inorganique étant du même ordre que celle du liquide extracellulaire et le potentiel électrique dans la cellule étant négatif, il est généralement admis que l'efflux de cet anion par la membrane basolatérale est passif. Dans leur étude sur des vésicules de membranes basolatéra-

les, Hoffman et *coll.* [11] avaient rapporté que le transport de PO_4 présentait une certaine dépendance du Na. Cette dépendance avait été attribuée par les auteurs à une contamination de leur préparation avec des vésicules de bordure en brosse. Pourtant, plusieurs années après, Schwab *et coll.* [33] confirmaient que le transport de PO_4 par la membrane basolatérale nécessitait la présence d'un gradient de Na tout comme au niveau de la bordure en brosse; mais, à la différence de celui-ci, ce transport était très nettement électrogénique car il augmentait lorsqu'un potentiel électronégatif était généré à l'intérieur des vésicules. Les auteurs ne précisent pas dans leur étude la proportion de vésicules orientées « à l'endroit » et « à l'envers », si bien qu'on ne sait pas si le mouvement de PO_4 qu'ils ont étudié correspond à celui qui serait dirigé de façon prédominante vers l'intérieur ou bien vers l'extérieur de la cellule.

Mécanismes régulateurs

Les deux principaux mécanismes régulateurs de ce transport sont l'hormone parathyroïdienne et le contenu du régime en phosphore.

Action de l'hormone parathyroïdienne (PTH). La PTH est une hormone fortement phosphaturique. Une parathyroïdectomie entraîne donc une rétention aiguë de phosphore. Cette hormone est distribuée uniformément à toutes les cellules de l'organisme. Les cellules cibles du rein contiennent des récepteurs spécialisés qui lient la molécule et servent de médiateur à son action. La membrane basolatérale du tubule proximal contient de ces récepteurs, capables de déclencher une série d'événements aboutissant à une régulation du transport de PO_4 par la MBB. L'interaction hormone-récepteur dans la membrane basolatérale active le système adénylate cyclase situé sur le côté interne de cette membrane. L'activation de l'adénylate cyclase implique une protéine membranaire, qui est en quelque sorte régulatrice de cette activation. Cette protéine, appelée N par Robdell [34], et « G unit » par Spiegel [35] lie la guanosine triphosphate (GTP) et la guanosine diphosphate (GDP). L'interaction de l'hormone avec les récepteurs affecte cette protéine de façon telle qu'elle lie préférentiellement la GTP et relâche la GDP. Seul le complexe protéine-GTP active l'adénylate cyclase. Par ailleurs ce complexe décroît l'affinité du récepteur pour l'hormone, ce qui a pour effet d'induire une certaine résistance à l'hormone à la suite d'une stimulation persistante.

Dans le tubule proximal, du moins chez le lapin et la souris, seule la PTH stimule la formation d'AMP cyclique. Le calcium intracellulaire, qui agit probablement par l'intermédiaire de la calmoduline, inhibe l'activité de l'adénylate cyclase. La séquence des événements qui font suite à la liaison de la PTH implique toute la cellule d'un pôle à l'autre. L'adénylate cyclase, une fois activée, stimule la conversion de l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine 3′5′ monophosphate (AMPc) qui sert de second messager à l'hormone. A son tour, l'AMPc active une ou des protéines kinases à la fois dans le cytosol et dans la bordure en brosse [17, 36]. Pour effectuer cette activation, l'AMPc doit donc migrer de la membrane basolatérale vers le pôle apical. Les mécanismes impliqués dans cette migration sont inconnus. Les protéines kinases phosphorylent finalement certaines des protéines membranaires à partir de l'ATP cytosolique. Cette phosphorylation engendre probablement des modifications dans la conformation de ces protéines. Mais, comme nous l'avons vu, le lien qui existe entre ces changements et l'effet physiologique (qui est une baisse de transport du PO_4 par la bordure en brosse) est loin d'être clair. Cette modification est assez stable cependant puisqu'elle persiste dans la membrane après sa séparation du reste de la cellule, reproduisant in vitro la baisse de capacité de transport qu'elle présentait in vivo.

Mécanisme d'action du phosphore alimentaire. La restriction en phosphore dans le régime alimentaire stimule plus que tout autre facteur, et de façon très spécifique, le transport tubulaire du PO_4. En quelques heures, celui-ci est accru, et en quelques jours, la phosphaturie tombe à des niveaux négligeables. Cette action du régime est tellement puissante que, lors d'une déplétion en PO_4, elle prévient l'effet phosphaturique de la PTH [37]. Pourtant, la formation d'AMPc est normale dans cette circonstance [37]. L'administration de $1,25(OH)_2\ D_3$ restaure la réponse à la PTH probablement en remédiant, au moins partiellement, à la déplétion en phosphore. Les mécanismes expliquant l'effet majeur du régime sur le transport du PO_4 sont encore moins connus que ceux impliqués dans l'action de l'hormone parathyroïdienne. Comme la restriction en phosphore s'accompagne d'une calciurie accrue et d'une baisse de l'excrétion d'AMPc, il a été postulé qu'une baisse de la sécrétion de PTH pouvait être à l'origine de la rétention de PO_4 par le rein [38]. Ce facteur ne saurait rendre compte seul de l'effet du régime puisque, d'une part, un animal parathyroïdectomisé nourri avec un régime pauvre en phosphore excrète moins de PO_4 que son homologue nourri normalement et que, d'autre part, une surcharge en PTH ne rétablit pas la phosphaturie.

La recherche d'une modification du métabolisme intracellulaire expliquant la rétention de PO_4 en cas de carence alimentaire ne fut pas fructueuse. La baisse de l'ATP intracellulaire ne survient que très lentement après plusieurs semaines de carence [38]. La gluconéogenèse rénale tend à être diminuée, ce qui devrait avoir davantage pour effet d'abaisser plutôt que d'augmenter le transport de PO_4 [23]. Il est possible que la 1α hydroxylase qui est l'enzyme responsable de la synthèse du métabolite actif de la vitamine D, la $1,25(OH)_2\ D_3$, dont l'activité est stimulée par la carence en phosphore, ait un rôle à jouer dans la réponse tubulaire au régime pauvre en phosphore. Comme nous l'avons vu, l'administration aiguë de $1,25(OH)_2\ D_3$ entraîne une augmentation du transport de PO_4 dans ce même segment. Mais cette observation ne veut pas nécessairement dire qu'il s'agit du mécanisme responsable de l'influence de l'apport diététique de phosphore.

Enfin, la bordure en brosse est modifiée par le régime carencé en PO_4 puisque, même après sa séparation du reste de la cellule, elle transporte davantage de PO_4 que celle d'un animal témoin. La phosphatase alcaline s'est vue attribuer un rôle dans cette adaptation. En effet, la déplétion en phosphore s'accompagne, à long terme, d'une augmentation de l'activité de cette enzyme [14]. Cette augmentation, cependant, est plus tardive que la réponse tubulaire au régime et, finalement, comme nous l'avons déjà mentionné, il n'y a pas de corrélation étroite entre les deux événements [15].

Les autres hormones. Plusieurs autres hormones ont une action sur le transport du PO_4 par la cellule du tubule proximal, mais à un degré moindre. La calcitonine exerce une action phosphaturique [39] lorsqu'elle est administrée de façon aiguë. Son mode d'action n'est pas clair car si elle freine la réabsorption du PO_4 dans le tubule proximal [39, 40], son action sur l'adénylate cyclase à ce niveau est pratiquement nulle du moins chez le lapin et chez la souris [41]. Comme, par ailleurs, l'effet phosphaturique de la calcitonine [42], et non l'effet sur l'AMPc [43], est additif à celui de l'action maximale de l'hormone parathyroïdienne, il semble que les mécanismes impliqués dans cette action hormonale soient indépendants du système AMP cyclique. Enfin, plusieurs autres facteurs, d'importance moindre que ceux déjà mentionnés, influencent le transport du PO_4 par le tubule proximal, comme l'hormone de croissance et l'insuline qui le stimulent légèrement.

Conclusion

Même si ces dernières années améliorèrent nos connaissances sur les différentes étapes du transport du PO_4 par la cellule tubulaire proximale, beaucoup d'inconnues persistent quant à la nature biochimique et physicochimique de chacune de ces étapes; et c'est probablement pour cette raison que les mécanismes pathogéniques impliqués dans les maladies congénitales de la réabsorption du PO_4 ne sont pas encore élucidés ■

Summary

The renal handling of phosphate has recently received much attention, particularly at the molecular level. Phosphate moves through the brush border membranes (BBM) against a chemical and electrical gradient, which necessitates a source of energy. This transport is coupled with sodium, which moves passively down its chemical and electrical gradient. The hypothesis of a secondary active transport of phosphate has been confirmed by experiments using purified membrane vesicles.

Phosphate uptake is modulated by the isolated BBM according to the status of tubular phosphate reabsorption presented in vivo, but no clear mechanism responsible for this "memory" has yet been identified. The mechanisms involved in the transport of phosphate through the cytosol are very poorly understood. The role of the concentration of the oxidized form of NAD remains controversial. Intracellular calcium is probably an important factor in phosphate tubular transport, possibly through its inhibitory effect upon the adenylate cyclase activity, which is an important step in the cascade of events initiated by PTH binding to the basolateral membrane. Finally the 1,25 $(OH)_2D_3$ which is synthesized in the proximal tubule cell, also regulates phosphate transport, possibly through a modification of the intracellular calcium concentration.

It is generally believed that phosphate crosses the basolateral membrane passively, along with a positive electrical potential. The main role of this membrane in phosphate transport could then be to carry the receptors of a variety of hormones, and particularly the parathyroid hormone, with the systems of regulatory protein and enzymes which are under its dependency.

RÉFÉRENCES

35. Spiegel AM, Levine MA, Aurbach GD, *et al.* Deficiency of hormone receptor adenylate cyclase coupling protein: basis for hormone resistance in pseudohypoparathyroidism. *Am J Physiol* 1982; 243: E 37-42.

36. Nimmo HG, Cohen P. Hormonal control of protein phosphorylation. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 1977; 8: 145-266.

37. Steele TH. Renal resistance to parathyroid hormone during phosphorus deprivation. *J Clin Invest* 1976; 58: 1461-4.

38. Kreusser WJ, Kurokawa K, Aznar E, Massry SG. Phosphate depletion. Effect on renal inorganic phosphorus and adenine nucleotides urinary phosphate and calcium, and calcium balance. *Miner Electrolyte Metab* 1978; 1: 30-42.

39. Gekle D, Kossmann K. Der Enfluss von thyreocalcitonin auf die phosphatreabsorption der Niere (Mikropunktionsuntersuchunger). *Monatsschr Kinderheilkd* 1968; 116: 308-10.

40. Berndt TJ, Knox F G. Proximal tubule site of inhibition of phosphate reabsorption by calcitonin. *Am J Physiol* 1984; 246: F 927-30.

41. Chabardes D, Imbert-Teboul M, Montegut M, Clique A, Morel F. Distribution of calcitonin sensitive adenylate cyclase activity along the rabbit kidney tubule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 3608-12.

42. Oberleithner H, Lang F, Greger R, Sporer H. Additivity of the phosphaturic action of parathyrin and calcitonin in the rat kidney. In: Massry SG, Ritz E, Jahn H, eds. *Advances in experimental medicine and biology. Phosphate and minerals in health and disease.* New York: Plenum Press, 1980: 129-34.

43. Kurokawa K, Nagata N, Sasaki M, Nakane K. Effects of calcitonin on the concentration of cyclic adenosine 3′5′ monophosphate in rat kidney in vivo and in vitro. *Endocrinology* 1974; 94: 1514-18.

TIRÉS A PART

M. G. Brunette : Département de Pédiatrie, hôpital Maisonneuve, 5415, boulevard de l'Assomption, H1T 2M4, Montréal.