

Mécanismes de transport ionique dans le néphron : apport des techniques électrophysiologiques

La bicouche lipidique des membranes cellulaires est, par elle-même, pratiquement imperméable aux ions et aux molécules organiques hydrophiles qui nécessitent donc, pour leur passage transmembranaire, la présence de « canaux » et de transporteurs protéiques. Il existe différents types de transports, actifs, facilités ou passifs, dont la caractérisation, surtout en ce qui concerne les molécules chargées, exige que soient connues les constantes électrophysiologiques du système. Appliquée au rein, une telle étude électrophysiologique permet d'identifier et de caractériser les systèmes membranaires responsables de la spécificité fonctionnelle des différentes régions du néphron.

Takis Anagnostopoulos

Le débit de filtration glomérulaire chez l'homme est de 180 litres d'eau et de 1,5 kg de NaCl par jour. 99 % de ce débit impressionnant est absorbé le long du tubule rénal. Cependant d'autres solutés sont sécrétés dans la lumière tubulaire. Il en résulte des concentrations intraluminales largement supérieures ou inférieures à celles du milieu intérieur de l'organisme. Des systèmes de transport originaux, présents dans chaque segment du néphron, participent à la genèse de ces différences ; ils sont assujettis à des fonctions de transport précises et modulables. Les techniques électrophysiologiques ont largement contribué à l'identification de ces systèmes.

Les tissus épithéliaux forment des couches, frontières qui séparent deux compartiments, le milieu extérieur (la lumière du tubule rénal ou celle de l'intestin par exemple) et le milieu intérieur. Les cellules de ces tissus possèdent deux domaines membranaires distincts : l'un, basolatéral, qui fait face au plasma, l'autre, apical, qui fait face à la lumière. Cha-

que domaine membranaire est doté de systèmes de transport qui lui sont spécifiques. La répartition asymétrique des systèmes de transport entre les deux pôles de la cellule a un sens fonctionnel : elle assure un transport net « vectoriel ». En effet, la fonction première d'un épithélium est de transporter un (des) ion(s) de la lumière vers le plasma (absorption) ou en sens inverse (sécrétion). Les ions transportés traversent donc les deux membranes successivement (voie transcellulaire) et/ou empruntent des interstices entre cellules adjacentes (voie paracellulaire, dite de *shunt*).

Systèmes de transport membranaires

Une membrane cellulaire est constituée d'une bicouche lipidique, quasiment imperméable aux ions. La translocation des ions, particules hydrophiles, est réalisée grâce aux supports matériels que sont les protéines. Il s'agit de protéines spécifiques, insérées dans la membrane, que l'on peut ranger dans trois classes distinctes : (1) les protéines

ADRESSE

T. Anagnostopoulos : *directeur de recherche à l'Inserm*. Inserm U. 323, hôpital des Enfants-Malades, 149, rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France.

qui assurent un transport actif primaire, communément appelées « pompes ». Une pompe est capable de transporter un (des) ion(s) contre une barrière énergétique défavorable. Elle y parvient grâce à un couplage à une réaction exergonique*, faisant en général appel à une hydrolyse d'ATP. Les pompes connues du néphron sont la $3\text{Na}^+-2\text{K}^+-\text{ATPase}$, la H^+-ATPase , la $\text{Ca}^{++}-\text{ATPase}$, et une $\text{K}^+-\text{H}^+\text{ATPase}$; (2) les protéines qui assurent des transports couplés ou secondairement actifs. Dans le cas le plus simple, deux substrats, A et B, sont transportés conjointement, dans le même sens (cotransport, A/B) ou en sens inverse (antiport, A-B). C'est la dissipation du gradient énergétique, en valeur absolue le plus élevé (par exemple celui du substrat A), qui fournit l'énergie nécessaire au transport couplé, mais parfois énergétiquement défavorable, du substrat B. La constitution préalable du gradient du substrat A résulte en général de l'activité d'une pompe. Il existe dans le néphron des transports couplés électroneutres (Na^+-H^+ , $\text{Cl}^--\text{HCO}_3^-$, cotransports $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$, Na^+/Cl^- et K^+/Cl^- ...) et électrogènes (antiport $\text{Ca}^{++}-3\text{Na}^+$, cotransports $\text{Na}^+/\text{2HCO}_3^-$ et $\text{Na}^+/\text{substrats organiques...}$). Tout transporteur électrogène véhicule une charge électrique nette (ions + ou -). De ce fait, il contribue au potentiel de membrane (V_m) et, en corollaire, son activité est influencée par la valeur de V_m ; (3) les protéines qui assurent un transport passif. Elles procèdent dans le sens du gradient énergétique qui les engendre et tendent à le dissiper. Cette définition s'applique évidemment à la « diffusion simple »; la diffusion d'un substrat neutre est une fonction linéaire de sa différence de concentration transmembranaire. La diffusion ionique résulte d'un gradient de concentration chimique et/ou une différence de potentiel électrique; elle procède au travers de canaux, plus ou moins spécifiques d'une espèce ionique. La diffusion « facilitée »

constitue un cas particulier : elle met en œuvre des transporteurs membranaires saturables, dont la cinétique s'apparente à celle des réactions enzymatiques de premier ordre.

Distinction entre transport actif et transport passif

La distinction entre transports actif et passif repose sur la notion fondamentale d'« équilibre électrochimique ». On définit d'abord le « potentiel d'équilibre » de l'espèce ionique i (E^i , en mV) à partir de ses concentrations, ou mieux de ses activités plasmatiques** α_{pi} , et intracellulaire, α_{ci} . Cette définition fait appel à l'équation de Nernst :

$$E^i = (RT/zF)\ln(\alpha_{pi}/\alpha_{ci}),$$

où R , T et F sont des constantes, z est la valence de i .

Cette équation traduit le gradient chimique de l'ion i en potentiel électrique, E^i . Pour chaque espèce ionique, E^i est comparé au V_m effectivement mesuré à travers la membrane cellulaire. Deux cas sont alors envi-

sageables : (1) L'espèce ionique étudiée est en équilibre électrochimique, défini par l'égalité $E^i = V_m$; cela signifie la neutralisation réciproque des forces chimique et électrique; (2) il existe une distribution de non-équilibre ($E^i \neq V_m$) en régime stationnaire; cela reflète nécessairement la participation d'un transport actif primaire ou secondaire, qui rend compte de la répartition de cet ion de part et d'autre de la membrane. La somme algébrique $V_m - E^i$ ($\neq 0$) constitue la force motrice à l'origine du transport diffusionnel (passif) net de l'espèce i .

Le transport transépithélial d'une espèce ionique i implique souvent au moins une étape active, apicale et/ou basolatérale. Pour des raisons d'économie énergétique, le transport actif de cet ion est en général situé sur une seule membrane; il réalise une α_{ci} de non-équilibre à travers la seconde membrane aussi : le gradient énergétique qui en résulte devient le moteur du transport net de i sur cette membrane. Ainsi, l'identification d'états de non-équilibre en régime stationnaire aux deux pôles de la cellule épithéliale, n'implique pas *ipso facto* la succession de deux processus actifs. Ainsi l'inhibition du système actif situé sur une membrane entraîne souvent la dissipation de l'état de non-équilibre au second pôle cellulaire : les transports (passifs) qui en dépendaient s'arrêtent.

Nécessité de l'approche électrophysiologique

Les notions résumées ci-dessus montrent que les fonctions de transport ne peuvent être raisonnablement appréhendées sans recourir aux concepts et aux techniques électrophysiologiques. La détermination de E^i (à partir de α_{pi} et α_{ci}) et la mesure conjointe de V_m permettent de définir la distribution de i dans une cellule quelconque. Dans le tubule rénal, on doit évaluer le potentiel apical (V_A) et basolatéral (V_B) (leur différence est le potentiel transépithélial, V_T), mais aussi α_{pi} , α_{ci} et l'activité luminale, α_{lum} . On détermine V_A , V_B et V_T à l'aide de micro-électrodes ordinaires, et les activités ioniques au moyen de micro-électrodes « sélectives » (MES) (figure 1). Ces techniques sont applicables in

GLOSSAIRE

V_m : potentiel de membrane. V_A , V_B , V_T : potentiel de la membrane apicale (A), basolatérale (B) et potentiel transépithélial (T), respectivement. E^i : potentiel d'équilibre de l'ion i . E_A^i , E_B^i , E_T^i : potentiel d'équilibre de l'ion i à travers les barrières A, B et T.
 G^i : conductance de l'ion i . G_A^i , G_B^i , G_T^i , G_S^i : conductances de i à travers les barrières A, B, T et S (shunt).
 G^i/G_m : conductance partielle de la membrane à l'ion i . t^i ($= G^i/G_m$): nombre de transport de l'ion i . R_A , R_B , R_T , R_S : résistance des barrières A, B, T et S respectivement. α^i : activité de l'ion i ; les indices pl, cell et lum désignent le plasma, la cellule et la lumière du tubule, respectivement. TCP: Tube contourné proximal. BALH: Branche ascendante large de l'anse de Henle. CC: canal collecteur (pour la disposition de TCP, BALH et CC, voir aussi « schéma du néphron », page 319). $f_A = R_B/(R_A + R_B)$: résistance fractionnelle de la membrane apicale. $f_B = R_A/(R_A + R_B)$: résistance fractionnelle de la membrane basolatérale. λ + constante d'espace.

* Exergonique : qui produit de l'énergie, par opposition à endergonique, qui consomme de l'énergie.

** Le terme activité se réfère aux seuls ions « libres », alors que la concentration comptabilise aussi les électrolytes non dissociés et les ions complexés par des protéines.

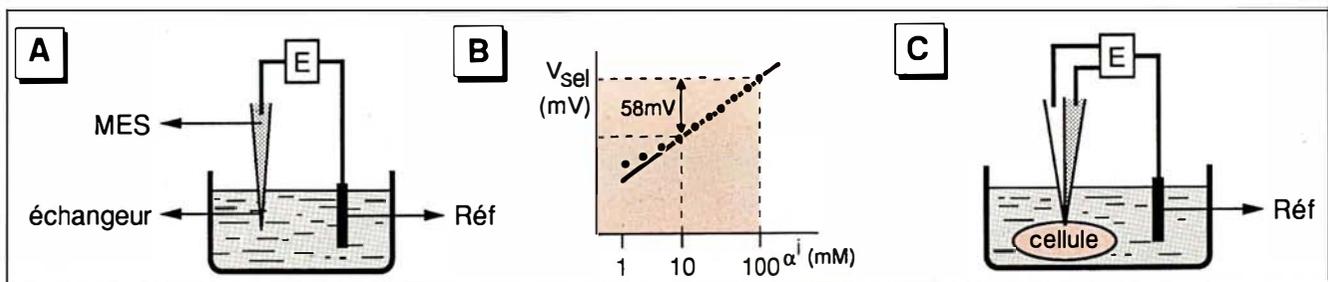


Figure 1. **Estimation de α^i à l'aide de micro-électrodes sélectives (MES) à échangeur liquide.** Leur construction est décrite ailleurs [1]. **A.** Un électromètre (E) à très haute impédance mesure le signal V_{sel} (mV) développé entre la MES et une référence (Réf), dans diverses solutions de l'espèce i . V_{sel} résulte de la diffusion préférentielle de i (par rapport à d'autres ions) dans l'échangeur. **B.** La relation entre α^i et V_{sel} est une fonction logarithmique : $V_{sel} = (RT/zF)\ln \alpha^i$. Idéalement, V_{sel} varie de 58 mV à 25°C (pour $z = 1$), lorsque α^i change d'un facteur 10 (pente idéale). Des différences de pente d'une MES à l'autre, surtout aux faibles α^i , nécessite leur calibration systématique. La sélectivité moindre (interférence) d'une MES à un autre ion j , réclame d'autres tests *in vitro* [1]. **C.** Le signal émis au cours d'un empalement cellulaire est la somme algébrique ($V_{sel} + V_m$). L'emploi de micro-électrodes à deux canaux permet de mesurer séparément ($V_m + V_{sel}$) et V_m . L'électromètre soustrait automatiquement V_m du signal composite $V_m + V_{sel}$; V_{sel} permet de calculer α^i .

in vitro, mais aussi *in vivo*, chez l'animal anesthésié. Pour connaître les facteurs qui contrôlent α_{cell}^i , on étudie les effets de changements de la composition du fluide périlitubulaire ou intraluminale, sur α_{cell}^i . En effet, α_{cell}^i est susceptible de varier soit sous l'effet d'une altération de la force électrochimique $V_m - E^i$, ce qui traduit l'existence d'un processus conducteur, soit à la suite d'une altération du gradient chimique d'un autre ion, j (ce qui dénote alors un transport couplé entre i et j), soit enfin sous l'effet d'inhibiteurs spécifiques de tel ou tel système de transport.

Chaque membrane cellulaire est dotée de conductances ioniques distinctes*, G^{Na} , G^{Cl} , G^K ... G^i , disposées en parallèle entre elles et dont la somme est la conductance globale de la membrane G_m (en l'absence de transporteurs électrogènes). La conductance membranaire totale, G_m , d'une cellule symétrique est définie par le quotient $\Delta I / \Delta V_m$; ΔI est le courant injecté dans la cellule et ΔV_m le changement de V_m qui en résulte. Il est également important de connaître la valeur des conductances G^i , car le courant I^i transporté par l'ion i est proportionnel à G^i , pour

une force motrice donnée [$I^i = (V_m - E^i) G^i$].

En fait, cette valeur de G^i ne peut être déterminée en valeur absolue; à défaut, on définit la notion de « conductance partielle » (ou « nombre de transport ») t^i qui est la fraction G^{Na}/G_m , G^{Cl}/G_m , G^K/G_m ... G^i/G_m (t^{Na} , t^{Cl} , t^K ... t^i , respectivement, où $\sum t^i = 1$). t^i peut être estimé à partir du changement de V_m obtenu lors d'un changement rapide de la concentration de i dans le milieu extérieur [2]. Par définition, $G^i = G_m t^i$. L'estimation rigoureuse des nombres de transport implique que le courant transmembranaire emprunte des conductances pures, à l'exclusion de tout transporteur électrogène. Dans les tissus épithéliaux, il convient de déterminer les conductances de toutes les voies de perméation (membranes apicale et basolatérale, voie de *shunt*). La figure 2 A-C illustre les méthodes de leur mesure dans le tubule rénal. La détermination des t^i y est encore plus délicate que dans les cellules symétriques (figure 2D).

La dernière-née dans l'arsenal des méthodes électrophysiologiques est la technique du *patch-clamp*. Elle permet de mesurer le courant transporté par un seul canal ionique. Elle consiste à circonscrire de façon étanche un fragment (*patch*) de membrane par l'orifice d'une micropipette (diamètre $\approx 1 \mu m$). On

mesure alors le courant unitaire I_{μ} , qui transite par un canal sous l'influence d'une différence de potentiel ΔV . Le quotient $I_{\mu} / \Delta V$ définit la conductance unitaire G_u^i (exprimée en pS, pSiemens). Une excellente mise au point a été récemment consacrée au *patch-clamp* dans *m/s* [5]. L'intérêt de cette approche est de véritablement visualiser les conductances membranaires et de quantifier leurs propriétés à l'échelle moléculaire. Une G_u^i est caractérisée par sa valeur (en pS), sa sélectivité à différents ions, sa dépendance au potentiel de membrane, à des hormones ou des médiateurs intracellulaires. La relation $G_m^i = G_u^i N P_{\square}$ montre que G_m^i dépend de G_u^i , du nombre total de canaux (N) sur la membrane et de leur probabilité d'ouverture P_{\square} à un instant donné. D'autres détails sur les méthodes d'investigation électrophysiologique peuvent être obtenus ailleurs [6]. Les notions développées ci-dessus seront illustrées avec la description de mécanismes de transport ionique dans trois segments représentatifs du néphron.

Tube contourné proximal (TCP)

Le débit d'absorption de NaCl dans le TCP est très élevé (Tableau I). Ce segment absorbe, la moitié du filtrat glomérulaire. En raison d'une per-

* La conductance G est par définition l'inverse de la résistance R .

Figure 2. Estimation des barrières résistives (R) du tubule rénal.

A. Organisation générale. La résistance de la paroi épithéliale, R_T , est composée d'une branche transcellulaire, R_{TC} ($R_{TC} = R_A + R_B$), et d'une branche paracellulaire (résistance de shunt, R_S) en parallèle avec R_{TC} . Par définition, $1/R_T = G_T = (G_{TC} + G_S)$. R_j est la résistance « jonctionnelle » entre cellules adjacentes, R_L la résistivité du fluide luminal.

B. Mesure de R_T . Trois électrodes, reliées à une source de courant (S) et à des électromètres (M_1, M_2), sont introduites dans la lumière du tubule. Le courant injecté par S s'atténue le long du « câble » luminal (zone hachurée) à cause de fuites transversales (I_j). Ces fuites engendrent un potentiel « électrotonique » transépithélial, $\Delta V_x (= I_x R_T)$. On sait par ailleurs que $\Delta V_x = \Delta V_0 e^{-x/\lambda}$. La « constante d'espace » du câble luminal est $\lambda_L = \sqrt{aR_T/2R_L}$. On calcule R_T à partir de λ_L , du rayon luminal, a , et de R_L , qui est fonction de la concentration ionique du fluide luminal. Par analogie au câble luminal, on détermine la constante d'espace du câble cellulaire λ_C à l'aide d'électrodes cellulaires (non illustré). Des équations appropriées fournissent ($G_A + G_B$) à partir de λ_C et λ_L [3].

C. Résistance fractionnelle basolatérale (f_B) et apicale (f_A). La fraction du courant injecté par S qui fuit à l'abscisse x_1 , engendre des potentiels « électrotoniques » basolatéral, ΔV_B , et transépithélial, ΔV_T , mesurés par M_1 . On définit $f_B = R_B/(R_A + R_B)$ et $f_A = R_A/(R_A + R_B)$; d'où $f_B + f_A = 1$. f_B est mesurée par le quotient $\Delta V_B/\Delta V_T$. Connaissant le rapport $R_B/R_A = G_A/G_B = f_B/f_A$ et la somme $G_A + G_B$ (voir ci-dessus), on calcule les valeurs individuelles de G_A et G_B [4].

D. Circuit équivalent électrique de la paroi épithéliale. E_A symbolise la « force électromotrice équivalente » de la membrane apicale, c'est-à-dire le V_m d'une cellule hypothétique, circonscrite par la seule membrane apicale et entourée de fluide luminal. E_B et E_S ont une signification analogue pour la membrane basolatérale et la voie de shunt. Cette modélisation souligne qu'en présence d'un « courant circulaire intraépithélial » (I_{cc}), $E_A \neq V_A$. En effet, $V_A = E_A + R_A I_{cc}$ il en est de même pour les autres barrières. Des équations appropriées (4) permettent de calculer un t_{Na^+} à partir de ΔV_A et de ΔV_S .

TCP = tube contourné proximal; BALH = branche ascendante large de l'anse de Henle; CC = canal collecteur

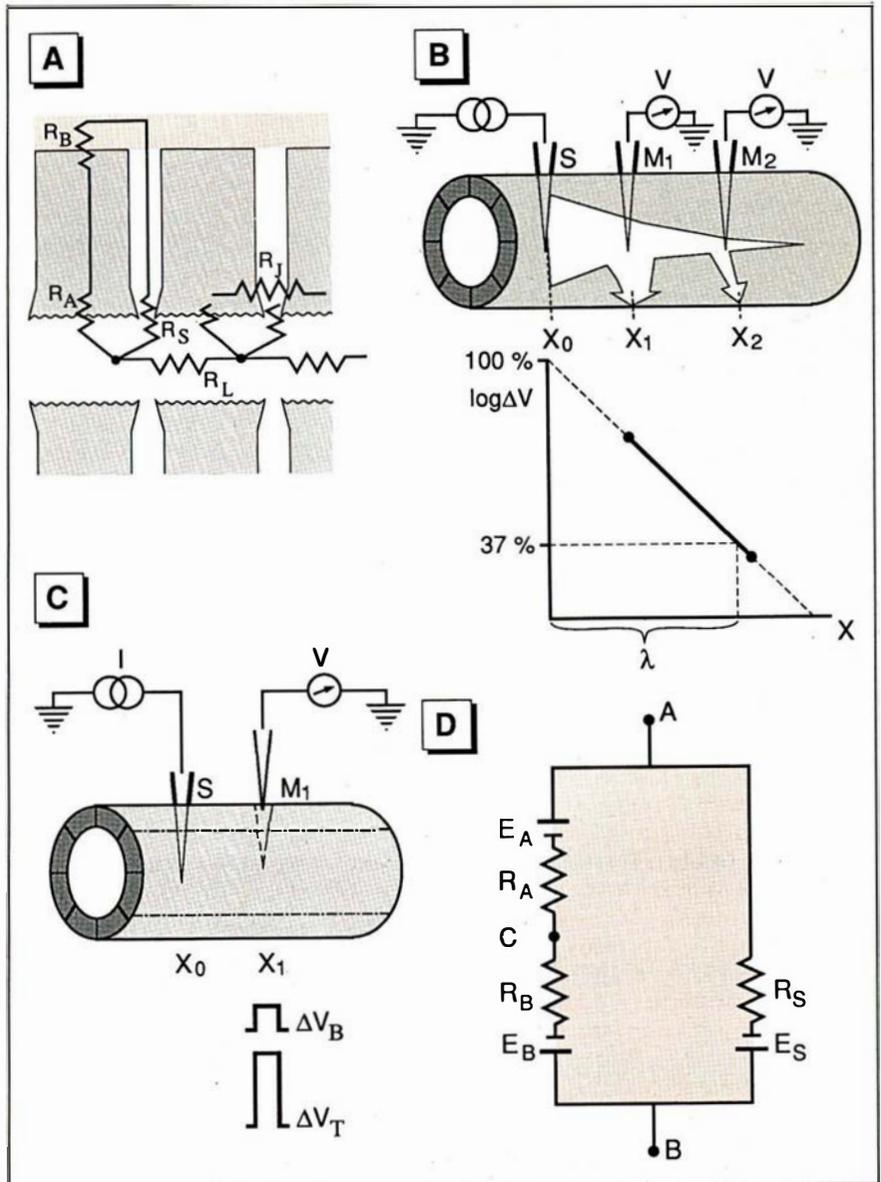


Tableau I
DONNÉES QUANTITATIVES SUR DES PARAMÈTRES RELATIFS
AUX FONCTIONS DE TRANSPORT, DANS TROIS SEGMENTS DU NÉPHRON

	TCP	BALH	CC
Débit d'absorption de Na^+ (nEq/cm ² -sec)	5-10	2,5-5	0,003-0,015
Perméabilité osmotique (cm ³ /cm ² -sec)	0,3	0,004	0,006-0,030
R_T (Ω cm ²)	5-10	35	100-3 000
R_A (Ω cm ²)	260	90	100-3 000
R_B (Ω cm ²)	90	45	40
f_A	0,65	0,65	0,80-0,99
V_B (mV)	-73	-70	-50 à -100
V_A (mV)	-75	-78	-20 à -80
V_T (mV)	+2	+8	+10 à -80

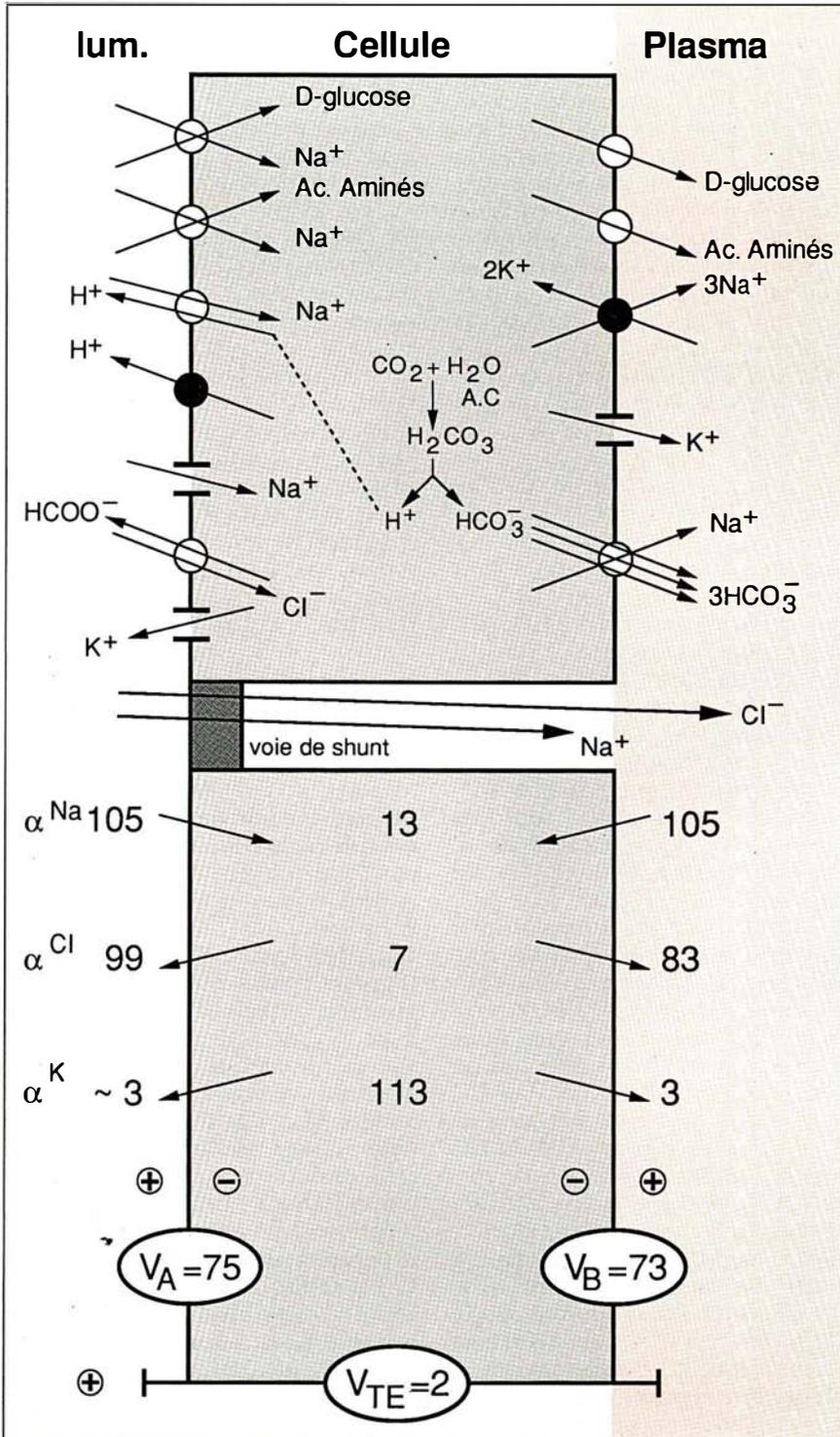


Figure 3. **Représentation schématique des systèmes de transport dans le tube contourné proximal (TCP).** Dans la partie supérieure de la figure sont schématisés les différents systèmes de transport : = désigne une conductance pure, O un transport couplé et ● une pompe. Une flèche ascendante désigne un transport énergétiquement défavorable (du substrat indiqué), une flèche descendante un transport énergétiquement favorable. La sortie basolatérale de glucose et de certains aminoacides est réalisée par diffusion facilitée. La voie de shunt, perméable, autorise la diffusion de Cl⁻ et de Na⁺. AC : anhydrase carbonique. Dans la partie inférieure de la figure (cellule du bas) sont inscrites les activités des ions Na⁺, Cl⁻ et K⁺. α_{pl}^i et α_{lum}^i sont calculées à partir de leurs concentrations respectives, multipliées par un coefficient d'activité $\lambda = 0,75$. α_{cell}^{Na} (8), α_{cell}^{Cl} (9) et α_{cell}^{K} (10). Les valeurs de V_A , V_B et V_T sont représentatives des 9/10 terminaux du TCP; dans sa portion toute initiale, $V_T = -2$ mV. Dans la moitié inférieure de la figure, les flèches indiquent l'orientation du transport passif de Na⁺, Cl⁻ et K⁺.

méabilité osmotique transmurale très élevée, le fluide luminal est quasi-iso-osmotique au plasma.

La voie transcellulaire. Classiquement, un tiers à une moitié du Na⁺

absorbé emprunte la voie transcellulaire, accompagné d'une fraction négligeable du Cl⁻ filtré [7]; la fraction restante est absorbée entre les cellules. C'est la pompe basolatérale

3Na⁺-2K⁺ qui rejette du Na⁺ vers l'interstitium et établit ainsi une valeur de α_{cell}^{Na} (≈ 13 mM) [8] nettement inférieure à α_{pl}^{Na} ($\approx \alpha_{lum}^{Na}$) ≈ 105 mM (figure 3). Au pôle apical,

RÉFÉRENCES

1. Lee CO. Ionic activities in cardiac muscle cells and application of ion selective microelectrodes. *Am J Physiol* 1981 ; 241 : H 459-78.
2. Hodgkin AL, Horowitz P. The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibres. *J Physiol (Lond)* 1959 ; 148 : 127-60.
3. Anagnostopoulos T, Teulon J, Edelman A. Conductive properties of the proximal tubule in *Necturus* kidney. *J Gen Physiol* 1980 ; 75 : 553-87.
4. Planelles G, Anagnostopoulos T. Electrophysiological properties of amphibian late distal tubule *in vivo*. *Am J Physiol* 1988 ; 255 : F 158-66.
5. Sauvé R. Le patch-clamp : une nouvelle façon de voir les canaux ioniques, *médecine/sciences* 1987 ; 3 : 538-45.
6. Frömter E. The electrophysiological analysis of tubular transport. *Kidney Int* 1986 ; 30 : 216-28.
7. Frömter E, Rumrich G, Ullrich KJ. Phenomenologic description of Na^+ , Cl^- and HCO_3^- absorption from proximal tubules of the rat kidney. *Pflug Arch* 1973 ; 343 : 189-220.
8. Yoshitomi K, Frömter E. How big is the electrochemical potential difference of Na^+ across rat renal proximal tubular cell membranes *in vivo*? *Pflug Arch* 1985 ; 405 : S 121-26.
9. Cassola AC, Mollenhauer M, Frömter E. The intracellular chloride activity of rat kidney proximal tubular cells. *Pflug Arch* 1983 ; 399 : 259-65.
10. Edelman A, Curci S, Samarzija I, Frömter E. Determination of intracellular K^+ activity in rat kidney proximal tubular cells. *Pflug Arch* 1978 ; 378 : 37-45.
11. Murer H, Hopfer V, Kinne R. Sodium/proton antiport in brush border membrane vesicles isolated from small intestine and kidney. *Biochem J* 1976 ; 154 : 597-604.
12. Yoshitomi K, Burckhardt BC, Frömter E. Rheogenic sodium-bicarbonate cotransport in the peritubular cell membrane of rat proximal tubule. *Pflug Arch* 1985 ; 405 : 360-6.
13. Karniski L, Aronson PS. Chloride/formate exchange with formic acid recycling : a mechanism of active chloride transport across epithelial membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985 ; 82 : 6362-5.

les forces chimique (55 mV) et électrique (75 mV) favorisent l'entrée apicale de Na^+ à travers une G^{Na} apicale (figure 3) ; une force basolatérale ($V_B - E_B^{\text{Na}}$), tout aussi grande (128 mV) et propice à la rétrodiffusion de Na^+ , demeure inopérante car la G^{Na} basolatérale est négligeable. La membrane apicale est par ailleurs dotée d'un symport* Na^+ -glucose et de symports Na^+ -aminoacides, en majorité électrogènes. Ils véhiculent une charge nette de Na^+ de la lumière vers la cellule. Cette charge positive (Na^+) est attirée par la négativité intracellulaire et par un gradient entrant $\alpha_{\text{lum}}^{\text{Na}}/\alpha_{\text{cell}}^{\text{Na}}$ qui est considérable (proche de 8). La densité des transporteurs dans les premiers 10 % du TCP est telle qu'elle est capable d'engendrer une négativité luminale (-2 mV) dans cette portion. Enfin, l'ion Na^+ peut emprunter un antiport apical Na^+ - H^+ [11] pour accéder de la lumière à la cellule et sortir avec le plasma grâce à un cotransport basolatéral électrogène $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ [12]. En résumé, l'entrée apicale de Na^+ est réalisée par diffusion, échange Na^+ - H^+ et cotransports Na^+ -substrats organiques ; sa sortie basolatérale est liée à la pompe $3\text{Na}^+ - 2\text{K}^+$ et au cotransport $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$. L'existence d'une $\alpha_{\text{cell}}^{\text{Cl}}$ supérieure à sa valeur théorique d'équilibre (de quelques mM, par rapport aux deux membranes limitantes du TCP) a été interprétée comme l'empreinte d'une entrée active de Cl^- au pôle apical. Or, le seul transporteur apical de Cl^- reconnu à ce jour est un échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCOO}^-$ faisant pénétrer du Cl^- dans la cellule en échange de formate [13]. Malgré la très faible concentration intracellulaire du formate, l'anion HCOO^- sécrété dans la lumière (en échange de Cl^-) rediffuse dans la cellule sous sa forme neutre HCOONa , assurant un recyclage ininterrompu. L'obstacle majeur à l'absorption transcellulaire du Cl^- est en fait situé au pôle basolatéral.

En dépit d'une force motrice $V_B - E_B^{\text{Cl}} \approx 8 \text{ mV}$ (calculée selon les données de la figure 3), favorable à l'absorption du Cl^- , l'absence d'une G^{Cl} basolatérale appréciable ou d'un transport actif secondaire approprié rend l'absorption transcellulaire du Cl^- problématique, d'autant plus qu'un échangeur basolatéral $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ [14] favorise plutôt la sécrétion de Cl^- ! L'absence de preuve en faveur d'une voie de passage transcellulaire de chlore privilégie la notion de la participation de la voie paracellulaire au transport proximal de cet anion. L'absorption du HCO_3^- est liée à l'hydratation intracellulaire du CO_2 en H_2CO_3 , qui se dissocie en HCO_3^- et en H^+ (figure 3). Il s'agit d'une réabsorption indirecte. Les protons sont sécrétés dans la lumière *via* l'antiport $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ [11], et accessoirement par une pompe primaire [15]. L'anion HCO_3^- est absorbé au pôle basal par le symport $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$, déjà mentionné. Le K^+ importé dans la cellule par la pompe $3\text{Na}^+ - 2\text{K}^+$ est recyclé grâce à une G^{K} basolatérale ; un canal K^+ a d'ailleurs été identifié sur cette membrane [16].

La voie paracellulaire. L'absorption paracellulaire de NaCl est attribuée à deux mécanismes : (1) Dans les 9/10 terminaux du TCP, l'orientation des forces électrochimiques transépithéliales de Na^+ et de Cl^- est favorable à l'absorption diffusionnelle du NaCl par la voie de shunt, voie perméable à ces ions ; (2) la voie de shunt est imperméable au bicarbonate. Le bicarbonate, absorbé selon la voie cellulaire, exerce un effet osmotique (absorption d'eau) paracellulaire. Des considérations théoriques, étayées par des données expérimentales, suggèrent que le flux osmotique paracellulaire d'eau entraîne aussi le soluté NaCl : ce mécanisme est connu sous le nom d'entraînement du soluté par le solvant, ou *solvent drag* [7].

La branche ascendante large de l'anse de Henle (BALH)

La fonction première de la BALH est la dilution du fluide luminal qui la parcourt. Un débit d'absorption de NaCl élevé et une perméabilité osmotique très faible (à peine 1 % de

* Symport est synonyme de cotransport.

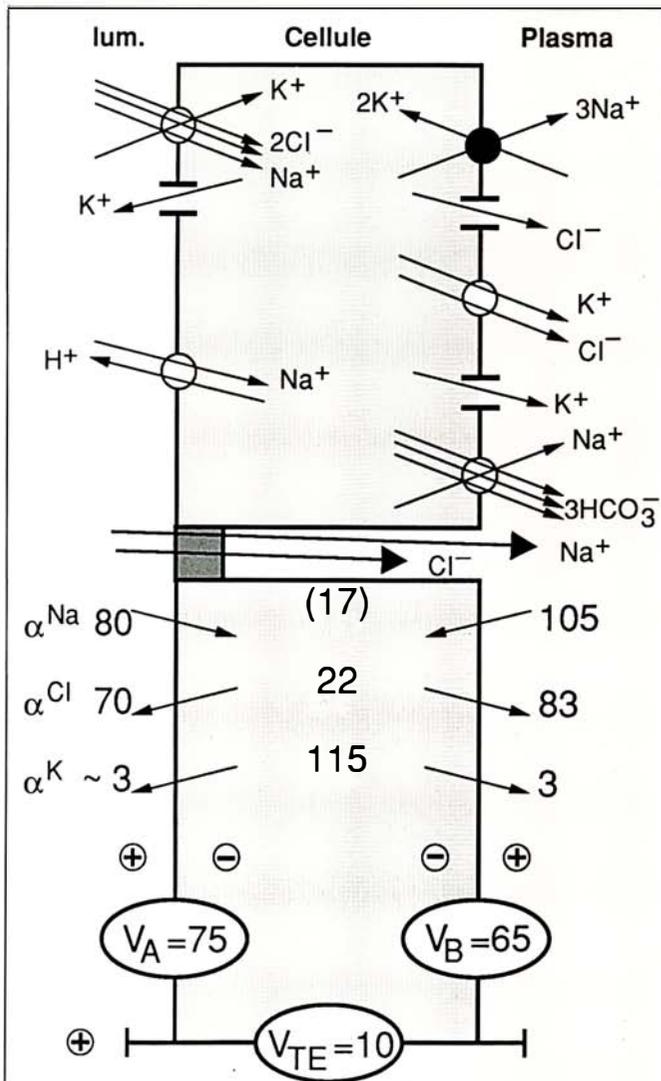


Figure 4. **Systèmes de transport dans la BALH.** Les conventions et les symboles sont ceux utilisés dans la figure 3. α_{cell}^{Cl} et α_{cell}^{K} ont été mesurées [17], α_{cell}^{Na} , mesurée chez l'amphibien [18], a été multipliée par 1,4, facteur des concentrations extracellulaires mammifère/amphibien. α_{lum}^{Na} et α_{lum}^{Cl} décroissent dans la BALH d'amont en aval; les valeurs utilisées ci-dessus correspondent à la portion médiane de ce segment. α_{lum}^{K} varie selon le contexte.

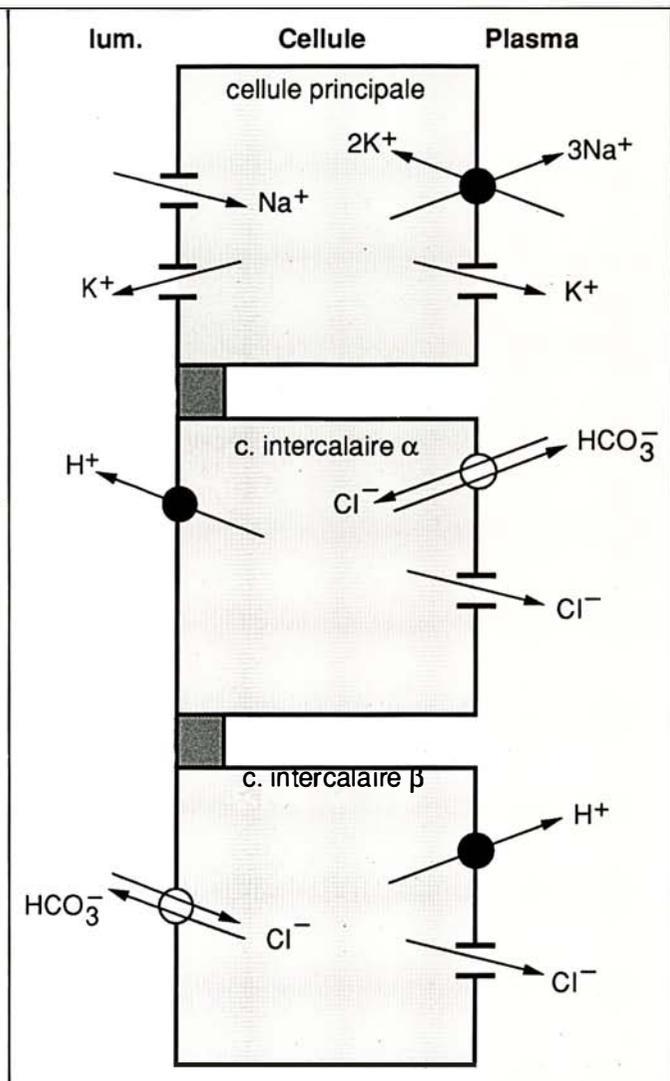


Figure 5. **Systèmes de transport dans les trois sous-populations cellulaires décrites dans le CC (20).** Les cellules β sont abondantes dans le CC cortical, les cellules α prédominent dans le CC médullaire. La G^{Cl} basolatérale n'est pas admise par certains auteurs et l'antiport $Cl^- - HCO_3^-$ n'est pas trouvé chez certaines espèces. Ordinairement, α_{lum}^{Na} et α_{lum}^{Cl} diminuent d'amont en aval. V_B , V_A et V_T varient d'une portion du CC à l'autre et d'une étude à l'autre (voir Tableau I).

celle du TCP) (Tableau I), entraînent une dilution progressive du fluide luminal. L'absorption de NaCl est à la fois transcellulaire et paracellulaire. Deux systèmes apicaux (le cotransport $Na^+/K^+/2Cl^-$ et une G^K apicale) et deux systèmes basolatéraux (la pompe $3Na^+-2K^+$ et une G^{Cl} basolatérale) sont particulièrement importants dans l'absorption de NaCl [17] (figure 4). La pompe $3Na^+-$

$2K^+$ crée les gradients chimiques transmembranaires des ions Na^+ et K^+ , c'est-à-dire une α_{cell}^{Na} inférieure et une α_{cell}^{K} supérieure à leurs valeurs respectives d'équilibre théoriques, aux deux pôles de la cellule (figure 4). Par ailleurs, α_{cell}^{Cl} est supérieure à sa valeur théorique d'équilibre, preuve indiscutable de l'existence d'un transport actif entrant de Cl^- dans la cellule. C'est le cotrans-

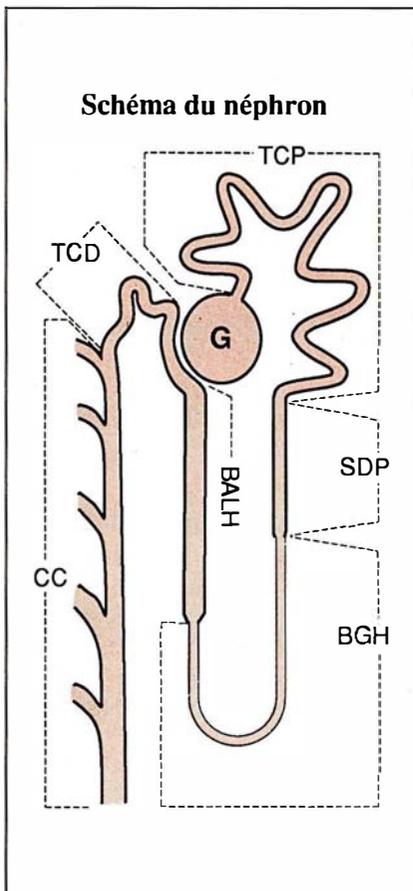
port apical $Na^+/K^+/2Cl^-$ qui fait entrer ces quatre ions dans la cellule, au cours de chaque révolution du transporteur : la sommation des gradients chimiques de deux ions Cl^- et d'un ion Na^+ , orientés dans le sens de l'absorption, fournit l'énergie nécessaire à l'entrée « ascendante », c'est-à-dire contre son gradient de concentration, de l'ion K^+ (figure 4). Au pôle basolatéral, le Na^+ est

RÉFÉRENCES

14. Edelman A, Bouthier M, Anagnostopoulos T. Chloride distribution in the proximal convoluted tubule of Necturus kidney. *J Membr Biol* 1981; 62: 7-17.
15. Bichara M, Paillard M, Levieil F, Prigent A, Gardin AM. Na: H exchange and the primary H pump in the proximal tubule. *Am J Physiol* 1983; 244: F 165-71.
16. Gögelein H, Greger R. Single channel recordings from basolateral and apical membranes of renal proximal tubules. *Pflug Arch* 1984; 401: 424-6.
17. Greger R. Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron. *Physiol Rev* 1985; 65: 760-97.
18. Guggino WB, Oberleithner H, Giebisch G. The amphibian diluting segment. *Am J Physiol* 1988; 254: F 615-27.
19. Hunter M, Kawahara K, Giebisch G. Calcium-activated epithelial potassium channels. *Min Electrol Metab* 1987; 14: 48-57.
20. Schuster VL, Stokes JB. Chloride transport by the cortical and outer medullary collecting duct. *Am J Physiol* 1987; 253: F 203-12.
21. Schlatter E, Schafer JA. Electrophysiological studies in principal cells of rat cortical collecting tubules. *Pflug Arch* 1987; 409: 81-92.
22. Palmer LG. Patch-clamp technique in renal physiology. *Am J Physiol* 1986; 250: F 379-85.
23. Schwartz GJ, Al-Awqati Q. Carbon dioxide causes exocytosis of vesicles containing H⁺ pumps in isolated proximal and collecting tubules. *J Clin Invest* 1985; 75: 1638-44.
- expulsé par la pompe 3Na⁺-2K⁺; le Cl⁻ emprunte une G^{Cl} et un cotransport K⁺/Cl⁻ [17]. Par ailleurs, le potassium, importé par la pompe 3Na⁺-2K⁺ dans la cellule, est recyclé au pôle basolatéral vers le plasma, grâce au cotransport K⁺/Cl⁻ mentionné et à une G^K basolatérale (figure 4). Lorsque la BALH absorbe du potassium, par exemple au cours des états kaliopéniques, l'ion K⁺ quitte la cellule par ces mêmes voies (K⁺/Cl⁻ et G^K). Au pôle apical, une conductance K⁺ recycle ordinairement le K⁺ importé dans la cellule par le cotransport Na⁺/K⁺/2Cl⁻ et peut contribuer à la sécrétion nette de K⁺ au cours des surcharges potassiques. Enfin, le fonctionnement coordonné d'un antiport apical Na⁺-H⁺ et d'un symport basolatéral Na⁺/nHCO₃⁻ (n > 1) est capable d'engendrer une sécrétion acide [18]. L'absorption de NaCl est sans doute la principale fonction de la BALH. Cette fonction est entravée par les diurétiques dits de l'anse (furosémide, bumétanide), qui déplacent compétitivement le Cl⁻ de son site au niveau du cotransporteur Na⁺/K⁺/2Cl⁻: d'où une salidiurèse accrue. La traduction électrophysiologique en est une diminution de α_{cell}^{Cl} et de α_{cell}^{Na}. A l'inverse, l'hormone antidiurétique stimule la réabsorption de NaCl dans la BALH médullaire, peut-être en augmentant la G^{Cl} basolatérale, via l'AMPc [17]. La traduction unitaire de cette G^{Cl} basolatérale est un canal Cl⁻, récemment identifié dans notre laboratoire par M. Paulais et J. Teulon. Un autre canal physiologiquement important a été reconnu, le canal K⁺ apical [19]. En conclusion, la multiplicité des systèmes élémentaires de transport permet à la BALH de privilégier telle ou telle fonction, selon les exigences métaboliques. Certes, du NaCl est toujours absorbé mais son débit net est variable. L'ion K⁺ est absorbé ou sécrété selon l'équilibre potassique. Enfin, une sécrétion de protons apparaît au cours de l'acidose, en particulier si elle est associée à une hyperkaliémie.

Canal collecteur (CC)

Les deux principales fonctions de transport ionique du CC sont la réabsorption de Na⁺ et l'excrétion de protons. Ces fonctions, toutes deux électrogènes, sont réalisées à faible débit transmural, mais contre des différences de potentiel chimiques et électrochimiques transépithéliales souvent considérables. Le CC est constitué de deux types de cellules (principales et intercalaires) dont la fréquence respective varie du cortex à la papille, et selon les espèces. La cellule principale (P) est le siège d'un transport net de Na⁺. L'ion Na⁺ diffuse de la lumière vers la cellule à travers une G^{Na} apicale (figure 5), selon une force motrice (V_A-E_{Na}^{Na}) favorable. Au pôle basolatéral, le Na⁺ est expulsé par la pompe 3Na⁺-2K⁺ vers le plasma (figure 5). Pour respecter l'électroneutralité, ce flux transcellulaire de Na⁺ est associé à un flux d'absorption de Cl⁻ et/ou à une sécrétion de K⁺. Or, il n'existe pas de systèmes de transport de Cl⁻ dans la cellule P. Le Cl⁻ peut être absorbé, certes, à travers la voie de *shunt*, lorsque la négativité luminale V_T (V_T s'échelonne de +10 à -60 mV) est supérieure en valeur absolue au potentiel chimique transépithélial adverse de Cl⁻; or ce n'est pas toujours le cas. On en a déduit que l'absorption de Cl⁻ relève aussi des cellules intercalaires. Par ailleurs, la pompe 3Na⁺-2K⁺ de la cellule P engendre l'entrée basolatérale de K⁺; cet ion est ensuite sécrété via une G^K apicale ou recyclé vers le plasma par une G^K basolatérale. On a montré l'existence d'une conductance basolatérale au K⁺ et des conductances apicales K⁺ et Na⁺; dans le CC cortical, le t^K basolatéral est ≈ 1,00, le t^K apical à 0,73 [21]. Un canal Na⁺ (5 pS) et deux canaux K⁺ (4 pS et 90 pS) ont été identifiés sur la membrane apicale du CC [22]. Les cellules intercalaires (α et β) sont reconnaissables à leur morphologie



G = gloménule ; TCP = tube contourné proximal ; SDP = segment droit du tube proximal ; BGH : branche grêle de l'anse de Henle ; BALH : branche large du segment ascendant de l'anse de Henle ; TCD = tube contourné distal ; CC = canal collecteur.

et à leur richesse en mitochondries. La cellule α est spécialisée dans la sécrétion acide. Elle possède à son pôle apical une pompe à protons, reconnue par un anticorps spécifique. Sa membrane basolatérale est dotée d'un échangeur anionique fonctionnant sur le mode $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (figure 5) : le gradient chimique de Cl^- entrant dans la cellule fournit l'énergie nécessaire à la sortie basolatérale de HCO_3^- . En définitive, la

fonction de la cellule α est la sécrétion de protons, c'est-à-dire l'épargne de bases. Le débit de Cl^- entrant au pôle basolatéral par l'intermédiaire de l'échangeur anionique serait recyclé grâce à une G^{Cl} basolatérale (figure 5). La cellule intercalaire β possède les systèmes de transport décrits dans la cellule α , disposés de façon différente. L'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, situé au pôle apical, sécrète du bicarbonate en échange de Cl^- entrant dans la cellule. La sécrétion apicale de HCO_3^- est contrebalancée au pôle basolatéral par une pompe à protons, expulsés en direction du plasma ; le Cl^- entrant *via* l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ quitte la cellule à travers une G^{Cl} basolatérale (figure 5). En conclusion, le CC dispose de trois voies cellulaires distinctes et d'une voie paracellulaire, réalisant ainsi des transports spatialement dissociés.

L'existence de deux sous-populations de cellules intercalaires, aux fonctions apparemment antinomiques (sécrétion acide contre sécrétion de HCO_3^-), confère une grande souplesse de fonctionnement au CC. Des stimuli appropriés, par exemple un pH intracellulaire abaissé au cours d'une acidose ou un pH cellulaire élevé lors d'une alcalose, peuvent activer respectivement les cellules α ou β , conformément aux exigences homéostatiques générales. Des pompes H^+ sont insérées sur la membrane apicale par exocytose, suite à une augmentation de la P_{CO_2} [23]. En revanche, le transfert de transporteurs d'une membrane à l'autre (interconversion α/β) semble improbable. Des incertitudes subsistent néanmoins ; en particulier, les activités ioniques intracellulaires n'ont pas été déterminées.

Cette description des principaux systèmes de transport dans trois segments du néphron est nécessairement incomplète et schématique. Elle met cependant en évidence l'apport des techniques électrophysiologiques, qui constituent une approche privilégiée dans l'identification et la caractérisation des systèmes membranaires de transport ionique dans le néphron. De nombreux domaines demeurent encore inconnus ; ils constituent autant de défis passionnants aux investigations futures ■

Summary

Mechanisms of ion transport in the nephron: contribution of electrophysiological techniques

In this review of kidney electrophysiology we recall the basic definitions of passive and active transports. The main transport parameters accessible to electrophysiological investigation are briefly described: intracellular and luminal ion activities, conductive barriers of the epithelium, partial ion conductances in individual cell membranes, single ion channels. In the proximal convoluted tubule, a substantial fraction of NaCl may be absorbed between adjacent cells driven by favorable electrochemical gradient; an apical Na^+/H^+ antiport and a basolateral $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ symport generate acid secretion. In the thick ascending limb of Henle's loop, a $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ symport promotes the apical entry of these ions into the cell. K^+ is recycled towards the lumen; Na^+ is absorbed actively and Cl^- exists *via* a Cl^- conductance and a K^+/Cl^- symport basolaterally. The collecting duct is endowed with three cell populations. The principal cells are assigned to the absorption of Na^+ . The α intercalated cell secretes protons, the β cell secretes bicarbonate.

TIRÉS A PART

T. Anagnostopoulos.