

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2002

Thèse n°

THESE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 2

**Mention : Sciences Biologiques et Médicales**

**Option : Biologie - Santé**

**Présentée et soutenue publiquement**

Le 25 novembre 2002

**Par Dany MULLER**

Né le 13 octobre 1973 à AIX-LES-BAINS

**Titre de la Thèse**

**ETUDE *IN VITRO* DE LA REABSORPTION TUBULAIRE PROXIMALE  
DE L'URANIUM. CONSEQUENCES FONCTIONNELLES.**

**Membres du Jury**

---

Pr M. FOURNIER -----	Président
Pr H. METIVIER -----	Rapporteur
Dr J. HARRISON -----	Rapporteur
Dr J-M. GELAS -----	Examineur
Pr J. CAMBAR -----	Examineur
Pr P. BROCHARD -----	Directeur de Thèse

## REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier la Cogema et l'Institut de Radioprotection et de Sûreté du Nucléaire (IRSN), co-financeurs de cette thèse qui s'est déroulée au sein du Laboratoire d'Etude Appliquées en Radiotoxicologie (LEAR à Pierrelatte.

Je souhaite ainsi remercier toutes les personnes de la Cogema qui ont assisté et participé de manière très active à l'établissement et la réalisation de cette thèse. Je voudrais donc remercier le Dr Gelas, le Dr Quesne et Monsieur Robert pour leur suivi, leurs conseils et leur grande sympathie. En espérant que cette thèse leur a apporté autant de satisfactions qu'à moi-même, et que celle-ci permette de promouvoir par la suite de nouveaux travaux de recherche sur la chimiotoxicité rénale de l'uranium.

Mes remerciements au Pr Patrick Brochard, Directeur du laboratoire de santé, du travail et de l'environnement (LSTE), pour avoir accepté de diriger cette thèse. Toute ma gratitude également envers le Pr Jean Cambar, Professeur de biologie de l'université des sciences pharmaceutiques de Bordeaux 2, pour ses conseils scientifiques, sa disponibilité, ses corrections et pour son soutien lors des nombreuses journées de thèses auxquelles j'ai participé.

Très sincères remerciements également au Pr Henri Métivier, Professeur à l'Institut National des Sciences et Technologies du Nucléaire (INSTN), et au Dr John Harrison du National Radiological Protection Board, pour avoir accepté de juger cette thèse en tant que rapporteur.

Toute ma reconnaissance envers le Pr Michel Fournier, Professeur à l'université des sciences et techniques de Lille, dont les compétences scientifiques et les conseils m'ont été d'une grande utilité. Je tiens également à le remercier pour sa sympathie mais plus encore pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Je ne saurais oublier d'exprimer toute ma gratitude et ma sympathie envers Marie-Hélène Hengé-Napoli. Tout d'abord responsable CEA de cette thèse, tu ne m'as pas laissé « tombé » par la suite malgré la distance et ta nouvelle fonction qui je sais te prend pourtant bien du temps. Je retiendrai notamment ton engouement pour cette thèse, ton implication tout au long du travail et toutes les discussions que nous avons pu avoir, scientifiques ou non. Un très grand merci également pour l'ensemble des démarches que tu as accompli pour mon avenir. Je n'oublierai jamais notre collaboration.

J'adresse aussi mes remerciements à Pascale Houpert, vétérinaire au Laboratoire d'Etudes Appliquées en Radiotoxicologie (LEAR), chargée de reprendre l'encadrement de la thèse en cours de route, pour son soutien moral ainsi que pour le temps passé sur la correction de mon premier article.

Ma reconnaissance va également envers François Paquet, Directeur du LEAR, qui m'a permis de poursuivre mes travaux au sein du laboratoire en toute quiétude. Je tiens aussi à le remercier pour sa grande disponibilité et pour m'avoir aidé dans certaines démarches administratives. Je souhaite aussi adresser toute ma sympathie à Marie Claraz, Valérie Chazel, et Fabrice Petitot pour leur bonne humeur et leur entrain scientifique.

Je n'oublie pas d'adresser mes remerciements à Eric Ansoborlo, ancien Directeur du LEAR pour avoir accepté cette thèse. Son accueil fut fort sympathique et son aide dans le domaine de la spéciation, qui s'est poursuivie après son départ du laboratoire, m'a été très précieuse. Un grand merci également à Sandrine Frelon, dont l'aide dans le domaine de la spéciation m'a été d'une grande utilité afin de préparer la soutenance.

Je ne puis oublier Nina Griffiths, pour son soutien et le temps accordé à la relecture de mes articles, pour son excellente humeur et son aide. Un grand merci aussi à Fabienne Lebrun pour m'avoir appris à dompter le PTI, bien que finalement je n'ai pas eu le temps de travailler dessus. Tu m'as connu en train de courir dans tous les sens, je te rassure, ça n'a pas changé.

J'en viens maintenant à vous autres, vous qui avez partagé le deuxième étage du laboratoire avec moi. Tout d'abord, un énorme merci à toi, Thierry, qui m'a permis d'être intégré en l'espace de 10 minutes par tout le monde. Fais attention à ton foie et reste tel que tu es ... sinon tu ne me reverras plus ... enfin si tu pouvais perdre 4 à 5 kg ... J'en profite également pour remercier Aurore, la mère de ton prochain enfant, qui m'a toujours accueilli à bras ouverts, même à 3 heures du matin.

Comment parler de Thierry, sans dire un mot sur Christophe alias Chronos, le roi du tempo. Ne t'inquiète pas, je reviendrai louer ton appartement pour faire des soirées et vider ton frigo : tu sais bien, chez moi c'est trop petit. Là, je m'en vais tester les hôpitaux de London, je te raconterai ...

Merci à Magali et Olivia. Bien que parfois un peu trop turbulentes (sales gamines ...), je pense sincèrement que si vous n'aviez pas été là, le laboratoire aurait perdu de sa fraîcheur et de son côté bon enfant. Je vais enfin pouvoir manger normalement, sans être obligé de cueillir mes fruits au plafond dans le bureau ... Bonne chance et courage à toi Magali.

Vient au tour de David, l'homme au QI de 192, dont l'algorithme "*discutatoire (du latin discuter sans fin)*" est souvent resté indéchiffrable au laboratoire. J'espère bien que l'on se reverra par la suite. Courage, un jour ta requête sera acceptée, enfin peut être. Si jamais j'ai un problème d'informatique, je te contacterai... certainement ... pas (un petit rappel : McAfee virus Scan ...).

Toute ma sympathie également à Bernadette et à Bernard : Bernadette la pensive souvent à mon écoute (en espérant que je ne t'ai pas trop cassé les pieds : d'ailleurs, c'est pour quand le ski ???), et Bernard pour avoir toujours répondu à mes questions et avoir été là lorsque j'avais besoin de toi. Juste un petit mot, arrête de faire la tête ...

Enfin, je tiens également à remercier ma mémé du laboratoire, je nomme Anne-Marie, pour l'intérêt que tu portes au travail que chacun fait et ta bonne humeur

(à croire que je me répète ... mais c'est de votre faute, vous n'aviez qu'à être de mauvaise humeur !!!).

Je ne puis terminer cette liste de remerciement sans attribuer ma plus grande pensée envers *Virginie*, pour m'avoir soutenu, encouragé et également aidé tout au long de ces trois années. Je n'oublie certainement pas mes parents, ma sœur et *Gilles* pour tout ce qu'ils ont fait pour moi et surtout pour leur soutien éternel.

J'adresse pour finir mes remerciements à *Nathalie*, *Caroletloulou*, *Mouton* et tous mes potes du foot, *Chrystelle*, *Bob* et *tchiote bobinette*, *Florence* et *Benoît*, *André* alias *Ahmed*, *Tatayet* et sa souris verte, *Titi*, *Vivi* et *Kinette*, et toutes les autres personnes que cette thèse m'a permis de rencontrer.

## TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>13</b>
<b>L'URANIUM</b>	<b>17</b>
<b>I/- A la découverte de l'uranium</b>	<b>17</b>
<b>II/- Généralités sur l'uranium</b>	<b>18</b>
II.1/- Caractéristiques physico-chimiques de l'uranium	18
II.1.1/- Propriétés chimiques	18
II.1.2/- Propriétés radioactives de l'uranium	20
<b>III/- Modes d'exposition à l'uranium</b>	<b>21</b>
III.1/- Contamination par inhalation (CIPR, 1994)	21
III.1.1/- Description de l'arbre respiratoire	21
III.1.2/- Zone de dépôt des particules en fonction de la taille (figure 2)	22
III.1.3/- Elimination des aérosols inhalés	22
III.1.3.1/- Dissolution et solubilité des particules	22
III.1.3.2/- Clairance des particules inhalées	24
III.2/- Contamination par blessure ou par dépôt	25
III.3/- Contamination par ingestion	25
<b>IV/- Devenir de l'uranium dans l'organisme.</b>	<b>26</b>
IV.1/- Biocinétique de l'uranium (CIPR, 1995)	26
IV.2/- Les complexes de l'uranium dans le sang	27
IV.3/- Excrétion rénale de l'uranium	28
IV.4/- Distribution tissulaire de l'uranium	28
IV.4.1/- Rétention dans les os	29
IV.4.2/- Rétention dans les reins	30
<b>V/- Toxicité de l'uranium</b>	<b>30</b>
V.1/- Radiotoxicité de l'uranium	31
V.2/- Toxicité chimique de l'uranium	31
<b>VI/- Exposition de l'homme à l'uranium</b>	<b>33</b>

---

**NEPHROTOXICITE DE L'URANIUM \_\_\_\_\_ 35**

**I/- Introduction \_\_\_\_\_ 35**

**II/- Le rein \_\_\_\_\_ 35**

II.1/- Définition \_\_\_\_\_ 35

II.2/- Anatomie générale \_\_\_\_\_ 35

II.3/- Vascularisation du rein \_\_\_\_\_ 37

II.4/- Structure du rein \_\_\_\_\_ 38

II.5/- Structure du néphron \_\_\_\_\_ 39

II.5.1/- Le corpuscule rénal ou corpuscule de Malpighi \_\_\_\_\_ 41

II.5.2/- Le tubule proximal (figure 9) \_\_\_\_\_ 44

II.5.3/- L'anse de Henlé (figure 9) \_\_\_\_\_ 44

II.5.4/- Le tubule distal (figure 9) \_\_\_\_\_ 46

II.5.5/- Le tubule collecteur (figure 9) \_\_\_\_\_ 47

**III/- Toxicité rénale de l'uranium \_\_\_\_\_ 47**

III.1/- Doses critiques \_\_\_\_\_ 47

III.2/- Physiopathologie associée à la néphrotoxicité de l'uranium \_\_\_\_\_ 48

III.3/- Atteinte glomérulaire \_\_\_\_\_ 49

III.2.1/- Altération indirecte des fonctions glomérulaires \_\_\_\_\_ 52

III.2.2/- Modifications ultra-structurales induites par l'uranium \_\_\_\_\_ 53

III.4/- Atteinte tubulaire \_\_\_\_\_ 53

**IV/- Réabsorption, excrétion et toxicité tubulaire proximale de l'uranium \_\_\_\_\_ 55**

IV.1/- Préambule \_\_\_\_\_ 55

IV.2/- Rôle des lysosomes dans l'accumulation et l'élimination de l'uranium \_\_\_\_\_ 56

IV.3/- Autres sites potentiels d'accumulation de l'uranium \_\_\_\_\_ 56

IV.3.1/- Le noyau \_\_\_\_\_ 57

IV.3.2/- Les mitochondries \_\_\_\_\_ 57

IV.4/- Mécanismes de toxicité de l'uranium \_\_\_\_\_ 57

IV.4.1/- Toxicité membranaire de l'uranium \_\_\_\_\_ 57

IV.4.2/- Effet de l'uranium sur les lysosomes \_\_\_\_\_ 59

IV.4.3/- Effet de l'uranium sur les mitochondries \_\_\_\_\_ 60

IV.4.4/- Mort cellulaire induite par l'uranium : nécrose ou apoptose ? \_\_\_\_\_ 61

IV.4.4.1/- La nécrose (**figure 13a**) \_\_\_\_\_ 61

IV.4.4.2/- L'apoptose ( <b>figures 13b et 14</b> )	61
IV.4.4.3/- Uranium et mort cellulaire	63
IV.4.5/- Résistance acquise	64
IV.4.6 /- Modèles de toxicité cellulaire	65
IV.4.6.1/-Modèle de Pasquier	65
IV.4.6.2/- Modèle de Mirto	65
IV.5/- Hypothèses de travail	67

## **L'ENDOCYTOSE** \_\_\_\_\_ **69**

### **I/- Généralité** \_\_\_\_\_ **69**

### **II/- L'endocytose clathrine-dépendante** \_\_\_\_\_ **69**

II.1/- Principaux déterminants moléculaires	71
II.1.1/- La clathrine et les cages de clathrine	71
II.1.2/- Les protéines adaptatrices	71
II.2/- Modèle d'endocytose clathrine-dépendante	72
II.2.1/- Recrutement des cargos et initiation de la formation des puits tapissés de clathrine	73
II.2.2/- Propagation du processus	73
II.2.3/- Bourgeonnement des vésicules	75
II.2.4/- Désassemblage de la matrice	76
II.3/- Devenir et transport des substances endocytées	77
II.4/- Acidification du milieu intra-endosomal	77
II.4.1/- Mécanisme de régulation de l'acidification endosomale	78
II.4.2/- Rôle fonctionnel du processus d'acidification.	78

### **III/- L'endocytose clathrine-indépendante** \_\_\_\_\_ **79**

III.1/- La phagocytose	80
III.2/- La macropinocytose	81
III.3/- L'endocytose cavéoline-dépendante	81
III.3.1/- Généralité	81
III.3.2/- Définition des caveolae	82
III.3.3/- L'endocytose par les caveolae	83

### **IV/- L'endocytose en phase fluide** \_\_\_\_\_ **85**

---

**LES CO-TRANSPORTEURS NaPi \_\_\_\_\_ 87**

**I/- Introduction \_\_\_\_\_ 87**

**II/- La famille des protéines NaPi : structure et localisation (tableau IV) \_\_\_\_\_ 87**

II.1/- La sous-famille NaPi I \_\_\_\_\_ 90

II.2/- La sous-famille NaPi II \_\_\_\_\_ 91

II.2.1/- le cotransporteur NaPi IIa \_\_\_\_\_ 91

II.2.2/- Le cotransporteur NaPi IIb \_\_\_\_\_ 92

II.2.3/- Le cotransporteur NaPi IIc \_\_\_\_\_ 92

II.2.4/- Structure tertiaire des cotransporteurs NaPi II \_\_\_\_\_ 93

II.3/- La sous-famille NaPi III \_\_\_\_\_ 93

**III/- Fonction(s) rénale(s) des membres de la famille NaPi \_\_\_\_\_ 94**

III.1/- Le cotransporteur NaPi I : transporteur d'anions organiques \_\_\_\_\_ 94

III.2/- Les co-transporteurs NaPi III : maintien de l'homéostasie cellulaire en Pi \_\_\_\_\_ 95

III.3/- Le cotransporteur NaPi IIa : Acteur principal de la réabsorption du Pi \_\_\_\_\_ 95

**IV/- Régulation physiologique de NaPi IIa \_\_\_\_\_ 97**

IV.1/- Principaux facteurs de régulation \_\_\_\_\_ 97

IV.1.1/- La concentration plasmatique en phosphate \_\_\_\_\_ 97

IV.1.2/- L'hormone parathyroïdienne (PTH) \_\_\_\_\_ 97

IV.1.3/- La vitamine D \_\_\_\_\_ 97

IV.2/- Les autres facteurs de régulation \_\_\_\_\_ 98

**V/- Mécanismes cellulaires impliqués dans la réabsorption du Pi. \_\_\_\_\_ 98**

V.1/- Modèle cinétique \_\_\_\_\_ 98

V.2/- Rôle des processus endo- et exocytiques dans la régulation de la réabsorption rénale du Pi (figure 21) \_\_\_\_\_ 100

V.2.1/- Rétro-régulation négative du transport \_\_\_\_\_ 103

V.2.2/- Rétro-régulation positive du transport \_\_\_\_\_ 103

V.3/- Voies de signalisation intracellulaire impliquées dans ... \_\_\_\_\_ 104

V.3.1/- ... la rétro-régulation négative induite par la PTH \_\_\_\_\_ 104

V.3.1.1/- Activation de l'endocytose des cotransporteurs NaPi IIa (**figure 22a**) \_\_\_\_\_ 104

V.3.1.2/- Effet indirect de la PTH (**figure 22b**) \_\_\_\_\_ 108

VI.3.2/- ... L'adaptation aux variations de concentration en Pi \_\_\_\_\_ 109

**MATERIELS ET METHODES \_\_\_\_\_ 110**

**I/ Modèles cellulaires d'étude *in vitro*. \_\_\_\_\_ 110**

I.1/ La lignée cellulaire LLC-PK<sub>1</sub>. \_\_\_\_\_ 110

I.2/-La lignée cellulaire MDCK transfectée. \_\_\_\_\_ 111

**II/-Culture cellulaire \_\_\_\_\_ 113**

II.1/ Congélation des cellules. \_\_\_\_\_ 113

II.2/ Décongélation des cellules. \_\_\_\_\_ 114

II.3/ Mise en culture et maintien de la culture cellulaire. \_\_\_\_\_ 114

**III/-Préparation des solutions d'uranium. \_\_\_\_\_ 115**

**IV/ Etude de cytotoxicité : test de la lactate déshydrogénase (LDH). \_\_\_\_\_ 115**

IV.1/ Principe du test. \_\_\_\_\_ 116

IV.2/ Solutions vendues avec le kit de détection. \_\_\_\_\_ 116

IV.3/-Protocole expérimental. \_\_\_\_\_ 116

**V/ Etude du transport de l'albumine-fitc, du phosphate et de l'uranium \_\_\_\_\_ 118**

V.1/ Etude de l'endocytose de l'albumine. \_\_\_\_\_ 118

V.2/ Mesure du taux de transport sodium-dépendant du phosphate \_\_\_\_\_ 119

V.3/ Mesure du taux de transport de l'uranium. \_\_\_\_\_ 120

**VI/ Etude de la spéciation de l'uranium. \_\_\_\_\_ 120**

**VII/ Révélation de rNaPi-2 par Western Blot. \_\_\_\_\_ 121**

VII.1/ Préparation des membranes. \_\_\_\_\_ 121

VII.2/ Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide  
(SDS-Page) \_\_\_\_\_ 122

VII.3/ Révélation de rNaPi-2 par Western Blot \_\_\_\_\_ 122

**VIII/ Caractérisation de l'apoptose par la méthode de l'échelle d'ADN. \_\_\_\_\_ 123**

VIII.1/ Principe du test \_\_\_\_\_ 123

VIII.2/ Méthodologie \_\_\_\_\_ 123

**IX/ Etude de l'effet d'agents biochimiques sur le transport de l'albumine-fitc, du phosphate, de l'absorption et de la cytotoxicité de l'uranium. \_\_\_\_\_ 124**

---

<b>X/ Statistiques</b>	<b>125</b>
<b>RÔLE DE L'ENDOCYTOSE DANS L'ASSIMILATION ET LA TOXICITE DE L'URANIUM</b>	<b>127</b>
<b>I/ Objectifs de l'étude</b>	<b>128</b>
<b>II/ Détermination des paramètres cinétiques</b>	<b>129</b>
II.1/ Caractérisation de l'endocytose de l'albumine-fite	129
II.2/ Caractérisation de l'absorption de l'uranium	134
<b>III/ Rôle de l'endocytose clathrine-dépendante vis-à-vis de l'absorption et de la cytotoxicité de l'uranium</b>	<b>136</b>
III.1/ Choix des conditions expérimentales et des agents pharmacologiques	136
III.1.1/ La température et l'hyperosmolarité	136
III.1.2/ Altération de la formation des vésicules d'endocytose	137
III.1.3/ Altération du cytosquelette d'actine et du réseau microtubulaire	138
III.2/ Altération pharmacologique de l'endocytose de l'albumine-fite	138
III.3/ L'endocytose : mécanisme principal de réabsorption de l'uranium	141
III.4/ Endocytose et cytotoxicité de l'uranium	143
III.4.1/ Mesure de la cytotoxicité	143
III.4.2/ Détermination des caractéristiques cytotoxiques de l'uranium	143
III.4.3/ Rôle de l'endocytose vis-à-vis de la cytotoxicité de l'uranium	145
III.4.4/ Spécificité de l'effet du PMA	147
<b>IV/ Discussion</b>	<b>147</b>

## **CYTOTOXICITE DE L'URANIUM : ROLE DU CO-TRANSPORTEUR**

<b>NaPi IIa</b>	<b>153</b>
<b>I/ Objectifs et hypothèse</b>	<b>153</b>
<b>II/ Homéostasie du phosphate et du calcium, et cytotoxicité de l'uranium</b>	<b>154</b>
II.1/ Effet de la concentration en phosphate	155
II.2/ Effet de la concentration en calcium	155
II.3/ Conclusion	155

---

<b>III/ Spéciation de l'uranium en fonction des concentrations extracellulaires en phosphate et en calcium</b>	<b>157</b>
<b>IV/ Cytotoxicité de l'uranium et transport du phosphate</b>	<b>159</b>
<b>V/ Inhibition du co-transporteur de type NaPi, cytotoxicité et assimilation de l'uranium.</b>	<b>161</b>
V.1/ Inhibition compétitive du co-transport NaPi	161
V.2/ Inhibition de l'activité du co-transporteur NaPi par la suppression du gradient électrochimique sodique.	163
<b>VI/ Sur-expression d'un co-transporteur de type NaPi IIa, absorption et toxicité de l'uranium.</b>	<b>165</b>
VI.1/ Validation du modèle MDCK transfecté	167
VI.2/ rNaPi-2 et cytotoxicité de l'uranium	169
VI.3/ rNaPi-2 et absorption de l'uranium	170
<b>VII/ Discussion</b>	<b>172</b>
<b>DISCUSSION GENERALE, PERSPECTIVES ET CONCLUSION</b>	<b>176</b>
<b>I/ L'endocytose clathrine-dépendante : mécanisme principal de l'absorption et de l'accumulation de l'uranium</b>	<b>177</b>
<b>II/ Les co-transporteurs de type NaPi</b>	<b>178</b>
II.1/ Transport de la fraction cytotoxique de l'uranium	178
II.2/ Système de transport secondaire de l'uranium	180
<b>III/ Effet de la concanavaline A</b>	<b>182</b>
<b>IV/ Mort cellulaire induite par l'uranium</b>	<b>183</b>
<b>V/ Validation des résultats obtenus sur la lignée cellulaire LLC-PK<sub>1</sub></b>	<b>185</b>
<b>VI/ Conclusion</b>	<b>187</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>189</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>192</b>

<b>REFERENCES</b>	<b>193</b>
-------------------	------------

<b>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS</b>	<b>235</b>
---------------------------------------	------------

<b>Publications :</b>	<b>235</b>
-----------------------	------------

<b>Communications :</b>	<b>236</b>
-------------------------	------------

## INTRODUCTION GENERALE

Découvert en 1789 par le chimiste allemand Martin Heinrich Klaproth, l'uranium a été nommé ainsi en référence à la planète Uranus, elle-même découverte huit ans auparavant. L'uranium existe partout à l'état naturel : on en retrouve dans les sols, l'eau et les roches, et en particulier les roches de type granitique. Longtemps utilisé par l'homme dans l'industrie pour la coloration du verre et des porcelaines, l'uranium fut par la suite à l'origine de la découverte en 1896 de la radioactivité par le chercheur français Henri Becquerel. Les travaux sur l'uranium se sont alors accélérés et ont notamment engendré la découverte de la radioactivité artificielle, de la transmutation et de la fission nucléaire.

Aujourd'hui, l'utilisation de l'uranium est essentiellement de deux types. Tout d'abord, en tant qu'élément radioactif. Il est utilisé comme combustible dans l'industrie nucléaire, source d'énergie en raison de la propriété fondamentale de l'isotope  $^{235}\text{U}$  d'être le seul élément naturel fissile. Ainsi, soumis à un bombardement de neutrons,  $^{235}\text{U}$  fissionne et donne naissance d'une part à deux nouveaux noyaux (produits de fission) et des neutrons qui peuvent être utilisés pour amorcer une réaction en chaîne et produire de l'énergie. A ce jour, près de 17% de l'énergie électrique mondiale et 80% de l'énergie électrique française proviennent de l'industrie nucléaire. Ensuite, en tant que métal lourd. Parmi les utilisations les plus connues, citons les matériaux de quille de bateaux, d'ailes et de gouvernails d'avions, de protection contre les effets biologiques des rayonnements et plus récemment ceux de munitions par les forces armées.

Les multiples manipulations et transformations de l'uranium lors des différentes phases du cycle du combustible, qui s'étendent de l'extraction minière au retraitement du combustible irradié en passant par la fabrication des éléments combustibles, ont modifié les modalités d'exposition et les probabilités d'intoxication par cet élément. Devant ces évolutions, les industriels et les personnes impliquées dans le domaine de la radioprotection se trouvent face à un défi, nécessaire à relever au bénéfice des travailleurs de l'industrie nucléaire et de manière générale au profit

de toutes les personnes exposées à l'uranium. Ce défi s'articule principalement autour de trois axes. Le premier concerne la protection en tant que telle, c'est-à-dire le confinement des ateliers de travail, la protection des individus face aux risques chimiques et radiologiques encourus, ainsi que le suivi médical des travailleurs. Le second implique la détermination des doses et des effets toxiques du radio-nucléide. Enfin, le troisième volet concerne la mise en place de thérapeutiques adaptées pour traiter les contaminations accidentelles qui sont susceptibles d'intervenir chez les personnes exposées.

L'exposition interne à l'uranium constitue le risque majeur pour les travailleurs des ateliers et des usines. Cette contamination met en jeu divers composés de l'uranium et s'effectue majoritairement par inhalation ou par blessure. Une autre voie de contamination envisageable, cependant peu probable en milieu professionnel, est l'ingestion d'uranium. Dans le cadre d'une contamination par inhalation, le système respiratoire constitue un organe cible pour l'uranium, mais également la première étape de sa distribution dans l'organisme. L'incorporation d'uranium par blessure est plus rare que l'inhalation accidentelle (1 cas sur 5), mais celle-ci présente tout de même des conséquences sanitaires généralement plus sérieuses. Enfin, du fait de son faible taux d'absorption gastro-intestinal (compris entre 0.2 et 2% : CIPR, 1995), l'uranium incorporé par ingestion ne donne lieu qu'à une faible distribution systémique.

Une fois introduit dans l'organisme, l'uranium est stabilisé dans le milieu systémique, soit sous la forme de complexes protéiques (transferrine, albumine...), soit sous la forme de complexes avec les différents anions organiques et inorganiques (carbonates, citrates, phosphates...). Ces derniers type de complexes, de faible poids moléculaire, passent alors la barrière glomérulaire rénale et sont partiellement excrétés dans les urines. Environ 50% de l'uranium ayant atteint le compartiment systémique sont excrétés par voie rénale, le reste est déposé principalement au niveau de deux organes cibles, le squelette (15 à 30%) et les reins (20 à 30%).

Les reins sont les sièges de l'action chimiotoxique de l'uranium. Les tissus osseux, compartiments de stockage à long terme, sont les cibles potentielles des

effets radiotoxiques du fait du caractère radioactif de l'uranium. Or, puisque l'uranium naturel est un élément faiblement radioactif, la toxicité chimique apparaît pour des doses qui sont telles qu'il ne peut pas y avoir d'effets radiotoxiques à court terme.

Cette chimiotoxicité rénale s'exerce principalement au niveau d'une partie spécialisée du néphron, le tubule contourné proximal, et plus précisément au niveau des segments S<sub>2</sub> et S<sub>3</sub> de ce tubule. Elle apparaît à partir d'une concentration de 3 µg/g de rein lorsque l'uranium est absorbé dans l'organisme sous une forme hydrosoluble, et se traduit par une altération des processus rénaux de réabsorption (acides aminés, protéines de bas poids moléculaire, ...). Lorsque la concentration en uranium atteint des doses critiques, il est alors observé une insuffisance rénale aiguë, puis une nécrose cellulaire qui prend naissance au niveau du segment S<sub>3</sub> avant de s'étendre de part et d'autre du tubule.

Malgré le risque de santé important que représente une intoxication par de l'uranium, il n'existe, à l'heure actuelle, aucune molécule non-toxique et efficace susceptible de limiter la fixation rénale de cet élément et d'en favoriser son excrétion. Il apparaît donc aujourd'hui essentiel de mieux comprendre le comportement et le devenir de l'uranium dans l'organisme, et plus précisément de caractériser l'atteinte toxicologique qu'il génère. Cela permettrait alors de proposer une action thérapeutique efficace visant à accélérer le processus d'élimination de l'uranium et de réduire la toxicité générée au niveau cellulaire.

Au cours de cette thèse, nous avons par conséquent axé nos travaux sur la meilleure compréhension et la caractérisation des processus membranaires et cellulaires responsables, d'une part, de la réabsorption tubulaire proximale, et d'autre part, de la toxicité de l'uranium. La complexité structurale et fonctionnelle du rein rendant difficile l'étude *in vivo* de ces processus, cela nous a conduit à envisager l'utilisation de modèles de cellules en culture. Ces derniers, largement validés dans la littérature et utilisés dans la détermination des mécanismes d'action toxique des xénobiotiques (tels que le cadmium, le mercure ou encore certains antibiotiques), offrent en effet l'avantage d'être des modèles d'étude simples et réductionnistes.

Les premières études ont été conduites dans le but de déterminer l'importance de l'endocytose dans les processus de réabsorption et de toxicité de l'uranium. Parmi les principales techniques mises en œuvre au cours de ce travail, citons les méthodes de mesure du transport de l'albumine-fitc, marqueur moléculaire d'un type spécifique d'endocytose, du transport du phosphate, du transport de l'uranium et de microtitration de la cytotoxicité induite par cet élément. Nos travaux ont été conduits à la fois sur le modèle d'étude LLC-PK<sub>1</sub>, d'origine tubulaire proximale, mais également sur un second système cellulaire d'origine tubulaire distal : le modèle MDCK, transfecté avec l'ADN complémentaire codant pour le co-transporteur sodium-dépendant du phosphate rNaPi-2.

L'exposé de ce travail comporte quatre parties majeures. La première partie est consacrée à la description bibliographique de l'ensemble des connaissances sur l'uranium, sur la néphrotoxicité de cet élément, sur l'endocytose et sur les mécanismes de transport du phosphate sodium-dépendant. La deuxième partie décrit les différentes techniques d'étude utilisées au cours de cette thèse. Nous aborderons, dans ce chapitre, les techniques de culture cellulaire, de mesure de l'endocytose et du transport du phosphate et de l'uranium, de détermination de la cytotoxicité, de séparation des protéines par électrophorèse et leur révélation par Western Blot, et enfin les méthodes de purification de l'ADN et de détermination de l'apoptose. La troisième partie de l'exposé concerne les résultats acquis au cours des expérimentations et tente d'amener des éléments de discussion. Au cours de celle-ci, nous discuterons du rôle de l'endocytose clathrine-dépendante et des co-transporteurs de type NaPi vis-à-vis de l'absorption et de la cytotoxicité de l'uranium. Enfin, la quatrième et dernière partie du manuscrit est consacrée à la discussion générale des résultats obtenus et aux perspectives de ce travail tout en faisant référence aux diverses données de la littérature.

## L'URANIUM

### I/- A la découverte de l'uranium

L'histoire de l'uranium commence au début du 16<sup>ème</sup> siècle dans la région montagneuse séparant la Bohème de la Saxe. C'est ici que la découverte du premier métal précieux, l'argent, engendra la naissance de la ville de Sankt Joachimsthal qui deviendra par la suite un lieu incontournable dans la production d'uranium. Sankt Joachimsthal fut rapidement le plus grand centre d'exploitation minière en Europe avant de devenir une ville fantôme après la guerre de trente ans durant la première moitié du 17<sup>ème</sup> siècle en raison de l'épuisement du filon de surface et d'un manque de matériel adapté pour réaliser une extraction en profondeur. Les mines n'ont cependant jamais été fermées, et l'amélioration des technologies employées a permis durant le 18<sup>ème</sup> siècle de reprendre la production d'argent. C'est cependant la découverte de l'uranium contenu dans la pechblende par l'allemand Martin Heinrich Klaproth le 24 septembre 1789 qui redonna réellement un second souffle au site de production. En 1841, Eugène Melchior Peligot réussit à purifier et à obtenir pour la première fois un échantillon d'uranium métal.

Tout d'abord utilisé pour la coloration du verre et des porcelaines, l'industrie de l'uranium connu par la suite un essor considérable. Les travaux menés par Henri Becquerel sur le comportement et les propriétés phosphorescentes de certains métaux, dont les sels d'uranium, marquèrent le passage à l'ère de la science atomique. Henri Becquerel découvrit en effet en 1896 que les sels d'uranium étaient capables de produire un rayonnement aussi pénétrant que les rayons X et susceptible d'impressionner une plaque photographique : la radioactivité était née. Le grand progrès dans l'ère atomique fut cependant déclenché par les physiciens français Pierre et Marie Curie. Cette dernière, dont le sujet de thèse de doctorat reposait sur la mesure précise des rayonnements émis par l'uranium, confirma tout d'abord la découverte de Becquerel, puis constata que certains minerais émettaient un rayonnement beaucoup plus intense que celui qui pouvait en être déduit à partir de leur teneur en uranium. A ce stade des recherches, la radioactivité apparaissait comme une propriété atomique.

Puis, vint la découverte en 1934 de la radioactivité artificielle par Irène et Frédéric Joliot-Curie, ce qui conduisit à l'accomplissement d'un immense pas en avant vers l'utilisation et le contrôle de l'énergie nucléaire. En 1938, les physiciens allemands Otto Hahn et Fritz Strassmann commencèrent à percevoir les possibilités de l'énergie nucléaire et analysèrent les propriétés de fission de certains noyaux d'uranium. Les recherches les plus importantes sur cet élément débutèrent alors. Quelques mois plus tard, Joliot-Curie et ses collègues Halban et Kowarski détectèrent l'émission de neutrons après fission d'un noyau d'uranium. Ces dernières découvertes, ainsi que les travaux d'Enrico Fermi, Leo Szilard et Carl David Anderson permirent la réalisation en 1942 de la première réaction nucléaire en chaîne. Cette réaction en chaîne entra dramatiquement dans l'histoire humaine avec le largage en août 1945 de deux bombes atomiques, l'une constituée d'uranium sur Hiroshima, l'autre constituée de plutonium sur Nagasaki. Plus pacifiquement, grâce à la volonté et l'énergie de Frédéric Joliot, parmi d'autres, la première pile nucléaire française, nommée ZOE, démarra en 1948. Aujourd'hui, près de 80% de l'électricité française provient de l'énergie nucléaire, le combustible étant essentiellement à base d'uranium.

## **II/- Généralités sur l'uranium**

L'uranium, de numéro atomique  $Z = 92$  et de symbole chimique U, est un métal qui fait parti de la famille des actinides. A l'état naturel, l'uranium est principalement composé de 3 isotopes :  $^{238}\text{U}$ ,  $^{235}\text{U}$  et  $^{234}\text{U}$ , dont les principales caractéristiques sont décrites dans le **tableau I**. L'uranium naturel a une teneur en  $^{235}\text{U}$  de 0.7%. Pour améliorer ses propriétés de combustible il peut être enrichi en isotope 235, le sous-produit contenant moins de 0.7% de cet isotope est alors appelé uranium appauvri.

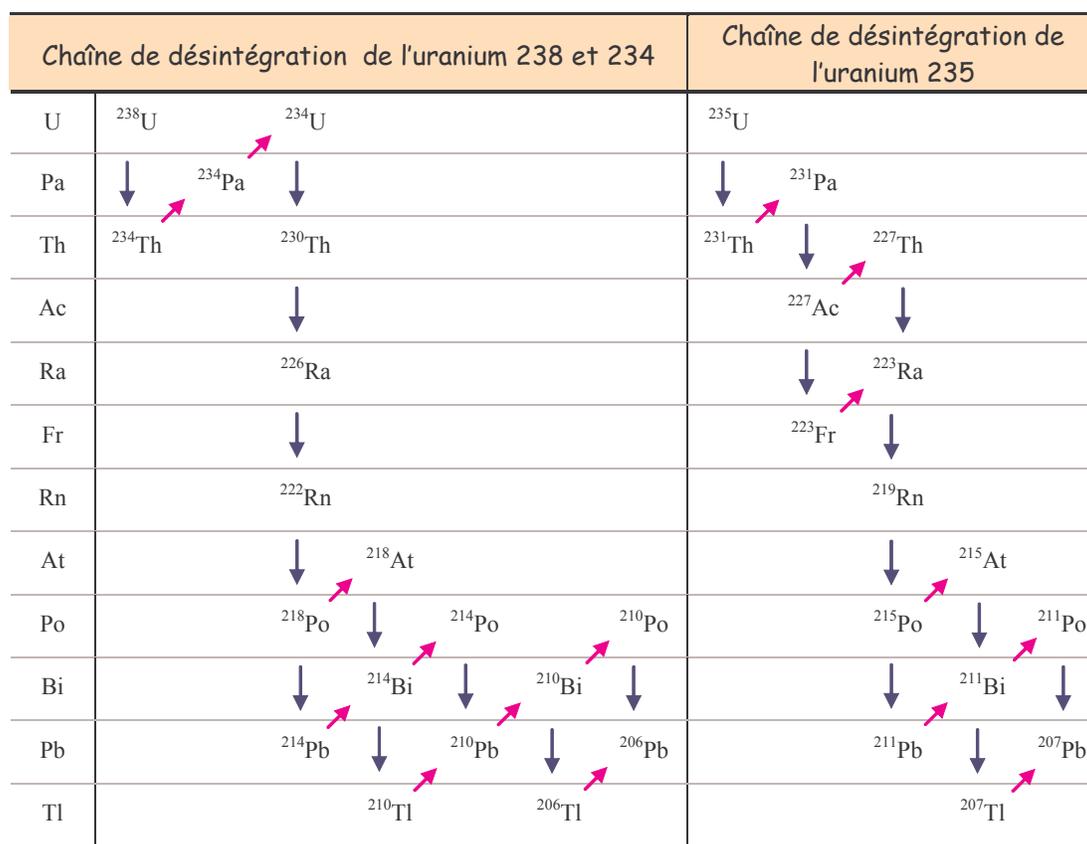
### **II.1/- Caractéristiques physico-chimiques de l'uranium**

#### ***II.1.1/- Propriétés chimiques***

L'uranium est un métal lourd de densité proche de 19, comparable à celle du tungstène et correspond à 1.7 fois celle du plomb. De masse atomique égale à 238.029, sous sa forme élémentaire, il s'agit d'un métal gris blanc présent dans la

Isotope	Période radioactive (années)	% masse	% radioactivité	Activité (MBq/kg)	Type de rayonnement	Energie des rayonnements alpha
$^{238}\text{U}$	$4.468 \times 10^9$	99.274	48.9	12.44	Alpha	4.2 Mev
$^{235}\text{U}$	$7.037 \times 10^8$	0.720	2.25	71.14	Alpha, Gamma	4.4 Mev
$^{234}\text{U}$	$2.454 \times 10^5$	0.0055	48.9	$2.303 \times 10^5$	Alpha	4.8 Mev

**Tableau I** : Teneur isotopique de l'uranium naturel et principales caractéristiques des isotopes.



**Figure 1** : Représentation schématique des chaînes de désintégration radioactive des isotopes naturels de l'uranium :  $^{234}\text{U}$ ,  $^{235}\text{U}$  et  $^{238}\text{U}$ .

↓ Représente une émission de particules alpha  
 ↗ Représente une émission de particules beta.

croûte terrestre à une concentration moyenne de 2 à 4 mg/kg (Bosshard *et al*, 1992). Les températures de fusion et d'ébullition sont respectivement de 1122°C et 3838°C.

L'uranium métal est pyrophorique et très réactif, pouvant réagir avec la plupart des éléments, mis à part les gaz rares. Il s'agit d'un réducteur puissant en présence d'eau et s'oxyde donc facilement à l'air humide, produisant soit de l' $\text{UO}_2$  soit de l' $\text{U}_3\text{O}_8$ .

Dans l'industrie nucléaire, l'uranium existe sous de nombreuses formes solides, liquides ou gazeuses, parmi lesquelles les composés hexavalents ( $\text{UF}_6$ ,  $\text{UO}_2\text{F}_2$ ,  $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ ) et les diuranates d'ammonium ( $\text{U}_2\text{O}_7(\text{NH}_4)_2$ ) sont les plus stables et biologiquement les plus solubles; les composés tétravalents ( $\text{UF}_4$  et  $\text{UCl}_4$ ) sont moyennement stables; enfin, les oxydes d'uranium ( $\text{UO}_2$ ,  $\text{UO}_3$ ,  $\text{UO}_4$  et  $\text{U}_3\text{O}_8$ ) ainsi que les hydrures ( $\text{UH}_3$ ) sont les formes les moins solubles. D'un point de vue toxicologique, il est nécessaire d'établir la différence entre les composés hydrosolubles et non hydrosolubles, car la transférabilité de l'uranium dans l'organisme dépendra principalement de cette caractéristique.

L'uranium possède 6 électrons de valence dans la configuration  $5f^3 6d^7 s^2$  (Pascal, 1960) et peut exister sous les états d'oxydations III, IV, V et VI (Lide 1994). L'étude thermodynamique de l'ensemble des espèces permet de conclure que dans la plupart des conditions rencontrées, les degrés d'oxydation (IV) et (VI) sont prédominants, les degrés d'oxydation (III) et (V) n'étant pas stables. En solution aqueuse, l' $\text{U(VI)}$ , qui est la forme la plus commune dans le cycle du combustible, n'existe pas et forme des complexes par l'intermédiaire de l'ion uranyle  $\text{UO}_2^{2+}$  (Gindle 1973).

### ***II.1.2/-Propriétés radioactives de l'uranium***

Les propriétés radioactives de l'uranium naturel sont résumées dans le **tableau I**. En dehors des trois isotopes radioactifs naturels, on connaît aujourd'hui 14 isotopes de l'uranium, allant de  $^{227}\text{U}$  à  $^{240}\text{U}$ , tous radioactifs, et parmi lesquels le plus abondant est  $^{238}\text{U}$ . Les isotopes naturels 238 et 235 sont la source de deux familles d'isotopes résultant d'une chaîne de décroissance radioactive qui aboutit à l'obtention d'un état stable : le plomb (**figure 1**).

Tous les isotopes naturels de l'uranium et certains de leurs descendants se désintègrent en émettant des particules  $\alpha$ . Les autres membres des deux séries se désintègrent quant à eux en émettant des particules  $\beta$  accompagnées d'une émission de rayonnements  $\gamma$ . Les particules  $\alpha$  émises par les trois principaux isotopes de l'uranium ( $^{238}\text{U}$ ,  $^{235}\text{U}$  et  $^{234}\text{U}$ ) sont de forte énergie (4 à 5 MeV), mais comme toute particule  $\alpha$ , de très faible parcours. Ce dernier est de quelques millimètres dans l'air et d'environ 40 micromètres dans l'eau et les tissus biologiques. En combinant le pourcentage de masse avec la demi-vie des trois principaux isotopes de l'uranium, on obtient que 48,9% de la radioactivité émise par l'uranium naturel provient de  $^{234}\text{U}$ , 2,25% de  $^{235}\text{U}$  et 48,9% de  $^{238}\text{U}$ . L'activité d'un gramme d'uranium naturel est de  $2.5 \cdot 10^4$  Bq et émet donc chaque seconde environ 25 000 particules alpha (Parrington *et al*, 1996), auxquelles il faut ajouter celles émises par ses éléments de filiation.

### **III/- Modes d'exposition à l'uranium**

En fonction de la voie d'entrée, le devenir de l'uranium dans l'organisme varie considérablement. En situation industrielle, les contaminations par blessure ou par inhalation représentent les deux voies principales de contamination. En revanche, le risque majeur de contamination pour le public est lié à l'apport alimentaire.

#### **III.1/- Contamination par inhalation (CIPR, 1994)**

##### ***III.1.1/- Description de l'arbre respiratoire***

L'arbre respiratoire inclut :

- une région extrathoracique qui comprend le nez antérieur (compartiment  $\text{ET}_1$ ), et le passage nasal postérieur, le larynx, le pharynx et la bouche (compartiment  $\text{ET}_2$ ),
- la région des bronches, composée de la trachée et des bronches principales ,
- la région des bronchioles,
- la région des alvéoles pulmonaires.

### ***III.1.2/- Zone de dépôt des particules en fonction de la taille (figure 2)***

L'inhalation d'aérosols conduit au dépôt de particules dans les différentes parties supérieures ou profondes de l'arbre respiratoire et leur répartition est fonction de leur diamètre. Ainsi, pour un diamètre de 0.1 micromètre, environ 30% des particules atteignent les parties les plus profondes du poumon (les alvéoles pulmonaires), tandis que pour un diamètre de 5 micromètres, seulement 5% d'entre elles y parviennent. Les particules de plus de 10 micromètres de diamètre sont quant à elles bloquées dans la partie supérieure de l'arbre respiratoire (nez, sinus, trachée).

### ***III.1.3/- Elimination des aérosols inhalés***

L'élimination des aérosols inhalés s'effectue selon deux mécanismes : (i) la dissolution vers le compartiment sanguin qui dépend directement de la solubilité des particules, (ii) la clairance par l'intermédiaire des macrophages alvéolaires, la remontée muco-ciliaire suivie de l'élimination des particules vers le tractus gastro-intestinal et vers les nodules lymphatiques pulmonaires via les canaux lymphatiques.

#### ***III.1.3.1/- Dissolution et solubilité des particules***

La dissolution des aérosols inhalés gouverne la cinétique de transfert des particules de leur porte d'entrée vers le sang et les liquides corporels. En dehors de la taille des aérosols inhalés, la solubilité de ces particules est donc un second paramètre très important à prendre en compte. En fonction de leur solubilité, les particules sont classées en trois catégories : F (fast), M (moderate) et S (slow).

- **pour le type F**, il existe une absorption rapide de pratiquement tout le matériel déposé dans la région des bronches, des bronchioles et des alvéoles pulmonaires, et environ 50% du matériel déposé dans la région extrathoracique ET<sub>2</sub>.

- **Pour le type M**, environ 70% des particules déposées dans la région alvéolaire atteignent éventuellement le sang. Il y a une absorption rapide d'environ 10% des particules déposées dans les régions des bronches et des bronchioles, et 5% du matériel déposé dans la région extrathoracique ET<sub>2</sub>.

- **Pour le type S**, le taux d'absorption est très faible pour les régions extrathoraciques ET<sub>1</sub> et ET<sub>2</sub>, des bronches et des bronchioles, et environ 10% du dépôt dans la région alvéolaire atteint éventuellement le sang.

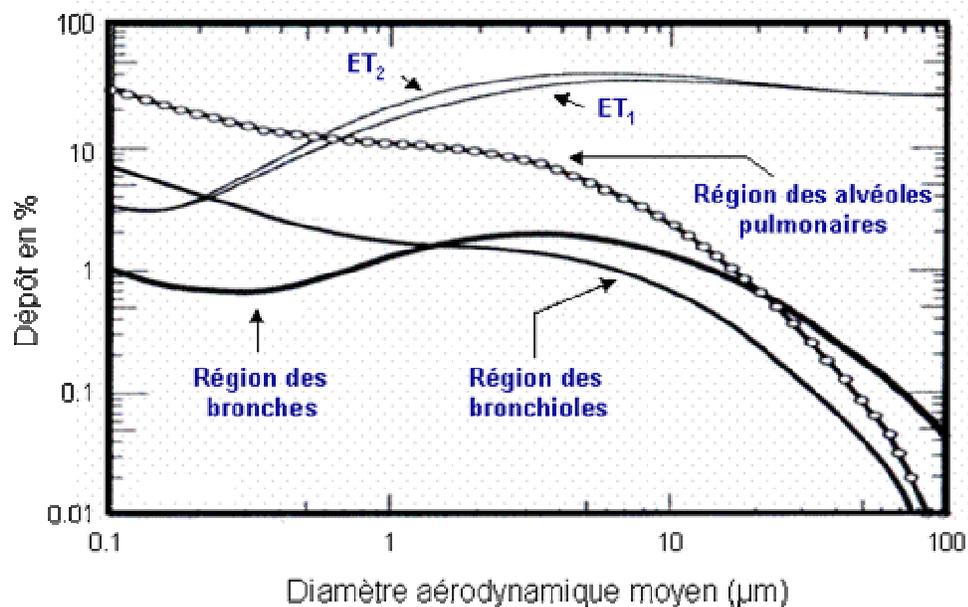


Figure 2 : Fraction des aérosols déposée dans les différentes régions de l'arbre respiratoire en fonction du diamètre aérodynamique moyen des particules (CIPR, 1994).

Taux de clairance			
De	à	Taux (jr <sup>-1</sup> )	Demi-vie
Al	bb	0.02	35 jours
		0.001	700 jours
		0.0001	7000 jours
bb	BB	2	8 heures
		0.03	23 jours
BB	ET <sub>2</sub>	10	100 minutes
		0.03	23 jours
ET <sub>2</sub>	GI	100	10 minutes
ET <sub>1</sub>	environnement	1	17 heures

**Tableau II : Valeurs de références des taux de clairance représentant le transport des particules inhalées entre les différentes régions de l'arbre respiratoire en fonction du temps.**

(Al) région des alvéoles pulmonaires, (bb) région des bronchioles, (BB) région des bronches, (ET<sub>2</sub>) compartiment extrathoracique comprenant le passage nasal postérieur, le larynx, le pharynx et la bouche, (ET<sub>1</sub>) compartiment extrathoracique composé du nez et (GI) tractus gastro-intestinal.

Ainsi, tandis qu'un composé d'uranium soluble peut diffuser rapidement dans le compartiment sanguin, un composé d'uranium insoluble demeurera sur son site de dépôt pendant plusieurs années et sera susceptible de délivrer localement des doses radioactives suffisantes pour induire un effet radiotoxique. Par exemple, 3 mois après l'inhalation par le rat de particules d' $\text{UO}_2$  très peu solubles, la teneur en uranium dans les organes périphériques tels que les reins est inférieure à 1% de la charge corporelle retenue, alors qu'elle est de l'ordre de 83% dans les poumons (Lang, 1994), le reste étant principalement éliminé dans les selles. Il en résulte par là-même une pathologie spécifique.

### *III.1.3.2/- Clairance des particules inhalées*

La clairance pulmonaire dépend directement du site de dépôt de l'aérosol. Concernant la région extrathoracique, les études chez l'homme suggèrent que la plupart du matériel déposé au niveau du compartiment  $\text{ET}_1$  est éliminé par des moyens dits « extrinsèques » tel que le fait de se moucher. A ce niveau, le temps de rétention des particules est de l'ordre de 1 jour. En revanche, la valeur de référence adoptée pour le transport muco-ciliaire du compartiment  $\text{ET}_2$  vers le tractus gastro-intestinal est de 10 minutes. Le transfert des particules des bronches vers le pharynx suit un modèle à deux compartiments pour lesquels les taux de transport ont été estimés à  $10 \text{ jours}^{-1}$  (soit  $t_{1/2} \sim 100$  minutes) et  $0.003 \text{ jour}^{-1}$  (soit  $t_{1/2} \sim 23$  jours). De manière similaire, le transfert des particules de la région des bronchioles vers les bronches suit également un modèle à deux compartiments. Les taux de transport adoptés sont respectivement  $2 \text{ jours}^{-1}$  (soit  $t_{1/2} \sim 8$  heures) et  $0.03 \text{ jour}^{-1}$  (soit  $t_{1/2} \sim 23$  jours). Au niveau de la région alvéolaire, les études expérimentales indiquent que le taux de transport des particules des alvéoles pulmonaires vers le tractus gastro-intestinal décroît d'environ  $0.003 \text{ jour}^{-1}$  au 25<sup>ème</sup> jour à  $0.0008 \text{ jour}^{-1}$  au 200<sup>ème</sup> jour après l'inhalation. Les mesures d'uranium dans les selles suggèrent également que le taux de transport continue de décroître jusqu'à environ  $0.0004 \text{ jour}^{-1}$  au 1500<sup>ème</sup> jour. Ces observations suggèrent ainsi que la rétention des particules d'uranium au niveau de la région alvéolaire suit un modèle à trois compartiments caractérisés par des taux de clairances respectives de l'ordre de  $0.02 \text{ jour}^{-1}$ ,  $0.001 \text{ jour}^{-1}$  et  $0.0001 \text{ jour}^{-1}$ . **Le tableau 2** résume les valeurs de référence qui ont été retenues par la CIPR.

### **III.2/- Contamination par blessure ou par dépôt**

Le dépôt de composés uranifères sur la peau ne présente en soi pas de danger particulier lié à l'irradiation. En effet, tandis que la distance parcourue par les particules  $\alpha$ , d'énergie équivalente à 5 MeV, est comprise entre 30 et 40  $\mu\text{m}$  dans les tissus biologiques, l'épaisseur de l'épiderme est généralement de l'ordre de 0.1 à 1.4 mm. D'autre part, le taux d'absorption percutanée de l'uranium dépend essentiellement de la solubilité des composés uranifères, les plus solubles étant rapidement incorporés. Par exemple, l'application chez le rat de 2.5 à 5 mg d'acétate d'uranyle par kg de poids corporel sur 8  $\text{cm}^2$  de peau engendre, dans les 24 premières heures, une nécrose des cellules tubulaires proximales (Sanchez *et al*, 2001), prouvant que l'uranium a gagné le compartiment sanguin. Les composés insolubles ne présentent pour leur part aucun danger réel.

Les contaminations par blessure peuvent être quant à elles beaucoup plus sévères, puisque les quantités de matière incorporées peuvent être très importantes et le transfert vers le milieu systémique très rapide. Dans le contexte d'une contamination par un composé uranifère soluble, il est observé un dépôt rapide et massif d'uranium dans les organes cibles, et une toxicité observable pour de faibles quantités. La biocinétique, la distribution et la toxicité de l'uranium seront décrites dans la suite du document (paragraphe IV.1, IV.4 et V du chapitre I et chapitre II).

### **III.3/- Contamination par ingestion**

En cas de contamination par voie orale, l'uranium est moins toxique qu'après incorporation par inhalation ou par blessure. Cela est lié à son facteur d'absorption gastro-intestinale relativement faible.

Les nombreuses études expérimentales réalisées chez l'animal, et une compilation des mesures effectuées sur l'homme montrent que le taux d'absorption gastro-intestinal d'uranium est de l'ordre de 1 à 2% de l'apport initial (Wrenn, 1985). La Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) a adopté un taux de transfert au niveau du tube digestif vers le sang de 2% pour un composé soluble et de 0.2% pour un composé peu soluble (CIPR, 1995). Il s'agit cependant de valeurs moyennes sachant que de nombreux facteurs physiologiques et chimiques, dont la solubilité du composé et l'espèce animale considérée, sont susceptibles de modifier ce facteur d'absorption gastro-intestinale (Leggett 1989).

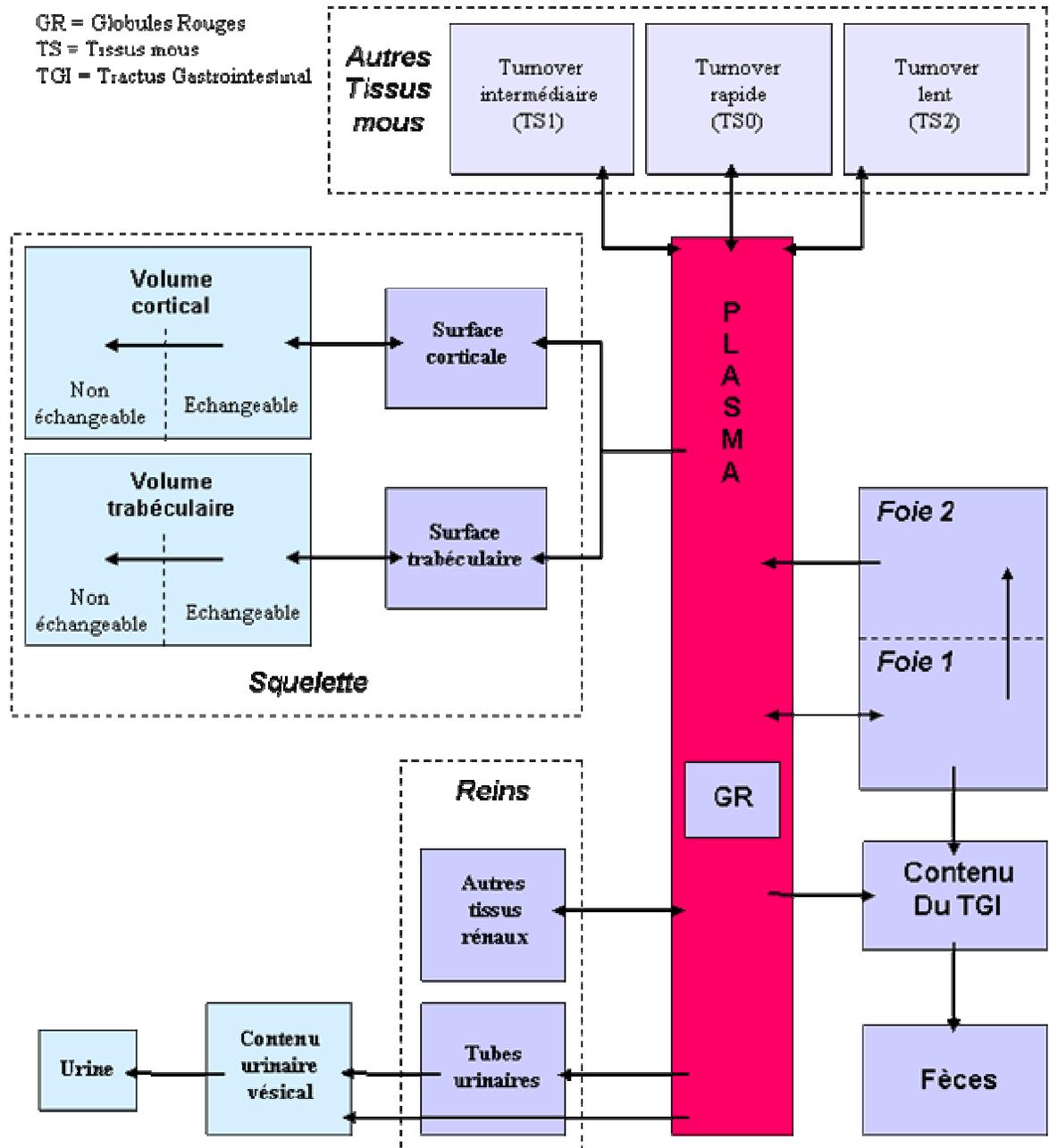
#### **IV/- Devenir de l'uranium dans l'organisme.**

Quelle que soit la voie de contamination et la forme chimique initiale, l'ion uranyle  $UO_2^{2+}$ , l'espèce la plus stable de l'uranium en solution, est très probablement la forme chimique présente dans les fluides biologiques (Gindle 1973 ; Durbin 1984). Son devenir dans l'organisme dépend principalement de deux paramètres fondamentaux : sa distribution (dépôt et rétention dans les organes cibles) et son élimination. La publication 69 de la CIPR décrit le comportement systémique de l'uranium (**figure 3 : CIPR, 1995**).

##### **IV.1/-Biocinétique de l'uranium (CIPR, 1995)**

Dans les minutes qui suivent l'administration intraveineuse de nitrate d'uranyle, près de 90% de l'uranium injecté est encore sous forme ultrafiltrable et se distribue dans un volume dont l'ordre de grandeur est celui des volumes extracellulaires. Sa clairance sanguine est cependant très rapide (Neuman *et al*, 1948 ). Seulement 25% de l'uranium injecté demeure encore dans le sang après 5 minutes, 5% après 5 heures, 1% après 20 heures et moins de 0.5% au bout de 4 jours (Bassett *et al*, 1948 ; Bernard et Struxness, 1957 ; Luessenhop *et al*, 1958).

Cette clairance sanguine élevée se traduit à la fois par un transfert rapide d'une fraction de l'uranium du milieu sanguin vers les organes de dépôt et par une excrétion également rapide dans les urines du reste de l'uranium. En effet, 40 minutes après l'injection intraveineuse (iv), 50% de l'uranium sont excrétés dans les urines, 25% déposés dans le squelette, 12% dans les reins et les 12% restant sont retenus dans les autres tissus de l'organisme (Neuman *et al*, 1949 ). A 24 heures, 20 à 30% de l'uranium sont déposé dans le squelette, 20 à 25% dans les reins et 40 à 60% sont éliminés dans les urines (Berlin et Rudell, 1979 ; Galle, 1982). Environ 10% supplémentaires sont excrétés dans les 5 jours qui suivent l'intoxication (Bassett *et al*, 1948 ; Bernard et Struxness, 1957 ; Luessenhop *et al*, 1958). Chez l'homme, environ 65% de l'uranium injecté sous forme de nitrate d'uranyle sont excrétés pendant les 24 premières heures (Bernard *et al*, 1957 ; Durbin 1984).



**Figure 3 :** Modèle biocinétique de l'uranium (CIPR, 1995).

#### **IV.2/-Les complexes de l'uranium dans le sang**

Comme nous l'avons déjà vu précédemment, l'ion uranyle  $\text{UO}_2^{2+}$  est l'espèce chimique la plus stable en solution (Gindle 1973 ; Durbin 1984), et c'est ce cation qui est stabilisé sous la forme de différents complexes dans le milieu systémique (Durbin et Wrenn, 1975 ; Pasquier et Bourguignon, 1977).

De manière générale, environ 30 à 40% de l'uranium sont liés aux protéines plasmatiques telles que l'albumine et la transferrine (Chevari et Likhner , 1968 ; Cooper *et al*, 1982), et environ 20% aux lipoprotéines des globules rouges (Chevari, 1968). Pour le reste, 50 à 60% de l'uranium sont complexés avec des anions organiques et inorganiques de bas poids moléculaires (Stevens *et al*, 1980 ; Cooper *et al*, 1982 ; Durbin 1984). Parmi ceux-ci, on retrouve principalement des espèces chimiques carbonatées, notamment  $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$  et  $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$ , lequel ne serait probablement pas formé dans des proportions appréciables à pH 7.4 dans le plasma sanguin (Durbin, 1984). De manière similaire, l'uranium serait complexé dans des proportions beaucoup plus faibles avec les anions citrates et phosphates circulant; bien que dans le cas du citrate les travaux de Cooper indiquent une complexation U-citrate à hauteur de 25% (Cooper *et al*, 1982).

#### **IV.3/-Excrétion rénale de l'uranium**

La clairance rénale de l'uranium est élevée : 50% de la quantité administrée sont éliminés dans les urines dans les premières heures qui suivent l'injection. Cette clairance est cependant sous la dépendance de nombreux facteurs. Parmi ceux-ci, on retrouve principalement le pourcentage d'uranium ultra-filtrable non-lié aux protéines plasmatiques (albumine et transferrine essentiellement) et la valeur du pH urinaire (Berlin et Rudell, 1979). C'est ainsi que chez les lapins soumis à un régime alimentaire abaissant le pH urinaire, 7% de la dose injectée (3 mg) sont éliminés dans les urines dès la troisième heure; ce pourcentage est de 21% lorsque le régime alimentaire est normal et encore plus élevé lorsqu'une perfusion de bicarbonates est effectuée simultanément à l'injection d'uranium.

#### **IV.4/-Distribution tissulaire de l'uranium**

Dans les heures qui suivent l'injection d'uranium par voie intraveineuse, la fraction non éliminée dans les urines est distribuée dans les différents tissus de

l'organisme (**figure 3 : CIPR, 1995**), et tout particulièrement dans les os et les reins qui constituent les deux principaux organes de dépôt de l'uranium. Chez le chien par exemple, 36% de l'uranium retenu dans l'organisme se situent dans les reins 1 jour après l'injection et 59% au bout de 14 jours ; la quantité retenue dans les os étant respectivement de 9 et 41% (Morrow *et al*, 1982).

#### **IV.4.1/- Rétention dans les os**

Dans les premiers jours, voir les premières heures qui suivent une injection unique de nitrate d'uranyle par voie intraveineuse, 20 à 30% en moyenne de la dose injectée sont contenus dans les tissus osseux, et plus particulièrement concentrés à proximité des zones vascularisées et de calcification active de l'os (Tannenbaum *et al*, 1951). Chez la souris, six semaines après une injection intrapéritonéale d'uranium 233 sous la forme d'un complexe citrate 85% de l'uranium restant sont retenus dans le squelette (Ellender *et al*, 1995).

Le mécanisme exact, la localisation précise et la forme chimique sous laquelle l'uranium est stocké ne sont cependant pas connus. En effet, bien qu'il soit supposé que la fixation de l'uranium sur l'os s'effectue par l'intermédiaire d'un transfert ionique de l'ion uranyle  $UO_2^{2+}$  en lieu et place du calcium  $Ca^{2+}$  par compétition d'homologie ionique (Berlin et Rudell, 1979 ; Priest, 1983 ; CIPR, 1995), il n'est pas encore déterminé si l'uranium est réellement incorporé au sein même du cristal hydroxyapatite ou s'il se dépose sous la forme de microcristaux insolubles de phosphate d'uranyle  $(UO_2)HPO_4 \cdot 4H_2O$ .

Enfin, contrairement à la rapidité avec laquelle l'uranium est déposé dans les tissus osseux, son élimination est lente : deux mois et demi après l'injection d'uranium sous une forme soluble, les autres organes se sont en grande partie épurés, ce qui fait que 90% de la quantité retenue dans l'organisme se retrouve au niveau de l'os (Tannenbaum *et al*, 1951). D'après les données obtenues chez l'homme, il faut environ 18 mois pour que 80 à 90% de l'uranium déposés dans les os soient éliminés de l'organisme (Bassett *et al*, 1948 ; Struxness *et al*, 1956 ; Bernard *et al*, 1957 ; Luissentop *et al*, 1958).

#### **IV.4.2/- Rétention dans les reins**

Quelle que soit l'espèce animale étudiée, les reins représentent le deuxième site majeur de rétention de l'uranium présent dans le milieu systémique. Ainsi, l'uranium filtré au niveau des glomérules est continuellement déposé sur la surface des cellules tubulaires rénales, et continuellement excrété à partir de ces mêmes surfaces vers la lumière tubulaire et vers l'urine. D'après Morrow, 6 heures après la procédure d'instillation d' $\text{UO}_2\text{F}_2$  à des chiens beagle, 44% de l'uranium absorbé par l'organisme sont retenus dans les reins; cette valeur étant de 16% après 24 heures (Morrow *et al*, 1982). De manière similaire, 1 à 3 jours après instillation ou injection de composés solubles, les reins humains, de chiens et de rats contiennent encore 12 à 25% de la quantité d'uranium ayant préalablement atteint le milieu systémique (Muir *et al*, 1960 ; Stevens *et al*, 1980 ; Morrow *et al*, 1982).

Or, si les mécanismes tubulaires rénaux de rétention de l'uranium ne sont pas encore bien déterminés, de manière logique, la quantité d'uranium retenue dans les reins est proportionnelle à la quantité filtrée, donc directement proportionnelle à l'excrétion. Comme dans le cas de son excrétion, la rétention rénale de l'uranium dépend fortement du pH urinaire (Dounce 1949 ; Yuile, 1973 ; Pasquier *et al*, 1979 ; Durbin, 1984 ; Moss, 1989 ; Leggett, 1989 ; Galle, 1997). A pH élevé, la plupart des complexes d'uranium sont stables et excrétés dans l'urine. En revanche, une acidification du pH urinaire à des valeurs proches de 6.5 dans les tubules rénaux résulte en une élévation du taux de rétention rénal d'uranium et en une réduction équivalente de son excrétion. Dans ce dernier cas, il est suggéré que les différents complexes se dissocient de manière pH-dépendante selon des degrés variables, et que l'ion uranyle ainsi libéré interagirait directement avec les protéines membranaires des cellules tubulaires.

#### **VI/- Toxicité de l'uranium**

Indépendamment de la quantité incorporée, la toxicité de l'uranium dépend fortement de la forme physico-chimique incorporée, de la voie de contamination, du taux d'enrichissement en uranium 235 et du temps d'exposition des tissus biologiques à l'uranium. La radioactivité spécifique de l'uranium naturel étant très faible (**tableau I**), la toxicité associée à une contamination par ingestion, par blessure

ou par inhalation est ainsi principalement de nature chimique, bien que dans les cas de contamination par inhalation cette toxicité puisse également être de nature radiologique. Cela est d'autant plus vrai, lorsque le temps d'exposition à l'uranium est prolongé et lorsque le composé uranifère en question est peu soluble.

### **V.1/- Radiotoxicité de l'uranium**

L'effet à long terme le plus important à la suite d'une exposition aux radiations ionisantes est l'induction de cancers. L'ADN est en effet la molécule biologique la plus sensible aux radiations ionisantes.

L'uranium étant principalement un émetteur alpha, il existe donc un risque biologique lié à sa radioactivité, au niveau de ses sites de rétention à long terme. Ce risque sera essentiellement osseux si l'uranium est absorbé sous une forme soluble ; il se situera au niveau des poumons et des ganglions lymphatiques lorsqu'il sera inhalé sous la forme de particules insolubles (Leach *et al*, 1973 ; Durbin et Wrenn, 1975). Par exemple, les études portant sur la rétention et les effets biologiques de poussières peu solubles de dioxyde d'uranium (UO<sub>2</sub>), administrées par instillation chez le chien, le singe et le rat sur une période de 5 ans, ont mis en évidence l'apparition de fibroses au niveau des ganglions lymphatiques trachéo-bronchiques et l'induction de modifications néoplasiques ou métaplasiques de l'épithélium pulmonaire pour des doses de l'ordre de 5 Gy dans les poumons et de 100 Gy dans les ganglions lymphatiques.

D'autre part, du fait de leur période radioactive plus courte que celle des autres isotopes de l'uranium, et donc de leur radioactivité spécifique beaucoup plus élevée, il est nécessaire de considérer les isotopes <sup>232</sup>U et <sup>233</sup>U comme étant des carcinogènes potentiels.

### **V.2/-Toxicité chimique de l'uranium**

Comme pour tout élément, la toxicité chimique de l'uranium est indépendante de l'isotope ou du mélange isotopique considéré. Les reins représentant l'un des deux sites principaux de rétention de l'uranium, il est logique de penser que la toxicité chimique rénale induite est l'un des effets majeurs qui a été observé à la fois chez l'homme et chez l'animal. C'est ainsi, que pour des quantités suffisamment

importantes, l'uranium provoque des lésions rénales, qui se traduisent par une altération des fonctions tubulaires et glomérulaires dont l'étendue et la persistance sont dépendantes de la quantité administrée et de l'espèce considérée (Hodge, 1973). Par exemple, l'estimation quantitative de la perturbation des fonctions rénales, obtenue 3 jours après l'injection d'acétate d'uranyle, est de 77% chez le rat (Natochin *et al*, 1994). L'examen histopathologique de reins de chiens, de rats ou encore de lapins, quelques jours après l'administration de quantités modérées met également en évidence des lésions nécrotiques des cellules tubulaires proximales (Hodge, 1973). La néphrotoxicité induite, effet principal de la contamination aiguë par l'uranium, sera décrite plus en détail dans le chapitre II.

Cependant, bien que la néphrotoxicité de l'uranium soit considérée comme l'effet toxique le plus sérieux, certaines études décrivent également des effets tumorigènes, génotoxiques et neurotoxiques, mais aussi une embryotoxicité et des effets tératogènes (Voegtlin et Hodge, 1949 ; Hodge, 1973 ; Yuile, 1973 ; Thompson, 1989 ; Lin *et al*, 1993 ; Miller *et al*, 1998a ; Pellmar, 1999a et 1999b ; Lopez, 2000).

Les effets neurologiques, qui incluent une paralysie des membres inférieurs, une perte de la vue et une perte de la coordination des mouvements, ont été observés après l'injection de quelques mg d'uranium par kg de poids corporel chez le lapin (Hodge, 1973). Plus récemment, les travaux faisant suite aux problèmes rencontrés au cours de la guerre du Golfe suggèrent également un effet potentiel de l'uranium sur le système nerveux central. Par exemple, 6 à 18 mois après l'implantation sous-cutanée de fragments d'uranium appauvri chez le rat, l'évaluation des fonctions physiologiques de l'hippocampe montre l'apparition de défaillances à la fois au niveau de la fréquence et de l'amplitude des signaux enregistrés (Pellmar TC, 1999a).

Concernant la génotoxicité potentielle de l'uranium, l'investigation des effets du nitrate d'uranyle sur la viabilité, le cycle cellulaire et l'induction d'aberrations chromosomiques sur des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) en culture, a révélé un accroissement de la fréquence d'apparition de micro-noyaux et d'échange de fragments chromosomiques (Lin *et al*, 1993). De manière similaire, il a récemment été démontré *in vitro* que le chlorure d'uranium est susceptible de provoquer une inhibition de la formation osseuse (Lopez *et al*, 2000) et la transformation de cellules

ostéoblastiques humaines en un phénotype tumorigène (Miller *et al*, 1998a).

Enfin, l'embryotoxicité et les effets tératogènes de l'uranium ont été observés chez la souris exposée, entre le 6<sup>ème</sup> et le 15<sup>ème</sup> jour de la gestation, à des concentrations d'acétate d'uranyle s'échelonnant entre 0.5 et 2 mg par kg et par jour, (Thompson, 1989). De telles doses engendrent une augmentation du nombre d'implantations embryonnaires non- viables et du taux de mortalité embryonnaire après implantation. A la naissance, le poids des fœtus viables est considérablement réduit et certains effets sur le développement, notamment sur le squelette, peuvent être mis en évidence.

## **VI/-Exposition de l'homme à l'uranium**

L'uranium étant un élément naturel ubiquitaire (Pascal, 1960 ; Bosshard *et al*, 1992), l'homme est ainsi continuellement exposé à l'uranium. Dans ce contexte, l'exposition interne s'effectue essentiellement par ingestion (alimentation) et par inhalation de particules d'uranium en suspension dans l'air. La quantité journalière ainsi absorbée par l'homme varie en moyenne de 1 à 5 µg d'uranium dans les régions dites non-contaminées et de 13 à 18 µg, voir plus, dans les zones minières (Wrenn *et al*, 1985 ; Singh *et al*, 1990). En effet, chaque année dans le monde, de grandes quantités d'uranium sont produites et converties en combustible nucléaire (Frost et Takala, 1994), ou destinées à une utilisation militaire (blindage, projectiles...). Or, une augmentation d'absorption d'uranium a pour principale conséquence une augmentation du risque d'intoxication. C'est ainsi qu'une étude comparative conduite sur l'effet chimique par ingestion chronique d'uranium contenu dans l'eau de boisson entre une population exposée à de faibles doses (<1 µg/l) et une autre exposée à une eau de boisson contenant de plus fortes concentrations (2 à 781 µg/l) montre l'apparition d'une atteinte tubulaire proximale caractérisée par un dysfonctionnement rénal (glucosurie et augmentation du taux d'excrétion de la phosphatase alcaline et de la β-2 microglobuline) chez les personnes appartenant au 2<sup>ème</sup> groupe (Zamora *et al*, 1998).

De plus, malgré les moyens humains et techniques de prévention et de sécurité, les travailleurs de l'industrie nucléaire et les militaires sont susceptibles d'être exposés à des quantités d'uranium beaucoup plus importantes (Fisher *et al*,

1990 ; Berard *et al*, 1994; Sun *et al*, 2000).

Dans le domaine de l'industrie du nucléaire, bien qu'aucune étude épidémiologique ne démontre de relation de cause à effet entre l'exposition à l'uranium et la mort survenue à la suite d'une insuffisance rénale aiguë ou chronique chez l'homme (Brown et Bloom, 1987 ; Dupree *et al*, 1987 ; Chekaway *et al*, 1988 ; Russell *et al*, 1996), certains rapports décrivent néanmoins l'apparition de signes cliniques de néphrotoxicité chez les personnes exposées. Une étude concernant les fonctions rénales de travailleurs retraités de l'industrie du nucléaire révèle, entre autre, chez ces personnes des manifestations caractéristiques d'une atteinte tubulaire, dont la sévérité est étroitement liée au temps d'exposition (Thun *et al*, 1985). De manière similaire, dans le cadre d'études de toxicité conduites au cours des années 1940, Dounce avait trouvé une élévation du taux d'excrétion de la catalase rénale dans les urines de 46 travailleurs de l'industrie du nucléaire (Dounce, 1940). A cela s'ajoute le risque de contamination interne lié aux accidents industriels (Fisher *et al*, 1990 ; Berard *et al*, 1994).

Concernant le risque d'intoxication lié à l'utilisation par les forces armées d'uranium appauvri dans leurs armes, l'état de la connaissance portant sur les conséquences sur la santé humaine n'en est qu'à son balbutiement. Ainsi, chez les vétérans de la guerre du Golfe ayant été contaminés par des fragments d'uranium appauvri, certaines études ont mis en évidence une relation statistiquement significative entre le taux d'excrétion urinaire en uranium et l'apparition d'effets secondaires. Huit ans après l'intoxication, la surveillance médicale périodique effectuée chez ces personnes montre en effet que le taux d'excrétion urinaire en uranium est toujours largement supérieur à la normale. Cela suggère ainsi une mobilisation lente et progressive d'uranium à partir des fragments retenus dans l'organisme et donc une exposition systémique chronique. Il semblerait d'autre part qu'il s'y associe des perturbations physiologiques subtiles et notamment des effets sur le système reproducteur et sur le système nerveux central (Mc Diarmid *et al*, 2000, 2001 et 2002). Aujourd'hui, l'étiologie de ces effets est incertaine et nécessite par conséquent l'établissement de nouvelles recherches pour confirmer et déterminer la pertinence de ces observations.

# NEPHROTOXICITE DE L'URANIUM

## I/- Introduction

La néphrotoxicité de l'uranium a été intensément étudiée chez l'animal, et parfois même chez l'homme. Comme cela sera décrit dans la suite de ce chapitre, cette néphrotoxicité se manifeste par des perturbations structurales et physiologiques caractérisées par des changements morphologiques de l'épithélium tubulaire et de l'endothélium glomérulaire, d'une altération des systèmes de transport tubulaires proximaux et d'une insuffisance rénale aiguë, voir chronique, pour de fortes concentrations en uranium. Ce chapitre comporte donc deux parties majeures : la première ayant pour objectif la description de l'anatomie du rein et de la structure du néphron, la seconde correspondant à une revue descriptive de l'état des connaissances concernant l'atteinte toxique rénale induite par l'uranium.

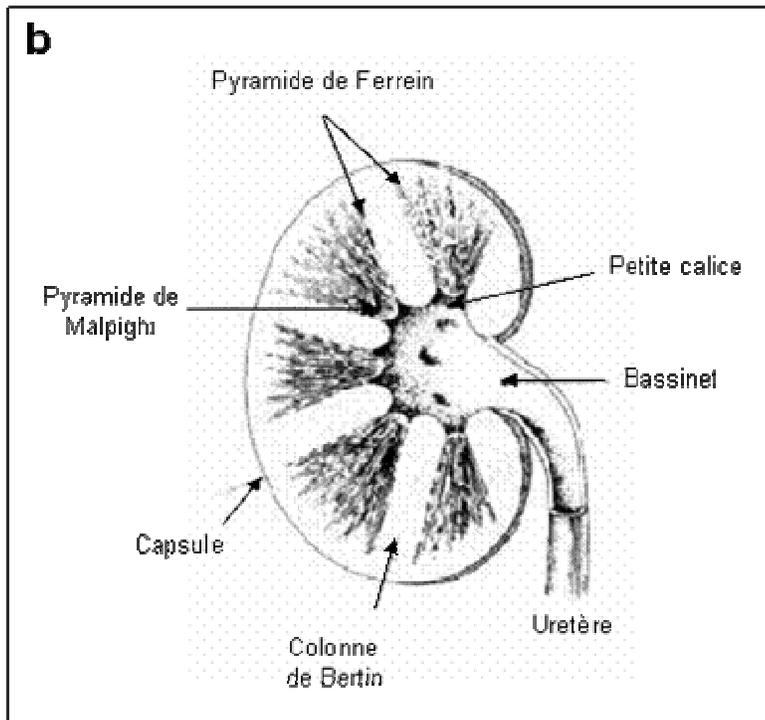
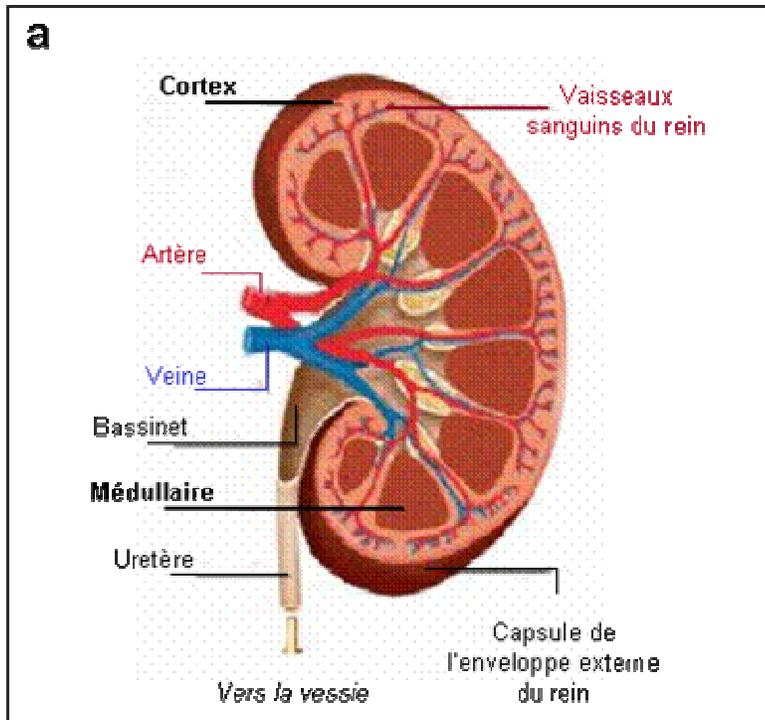
## II/- Le rein

### II.1/- Définition

Le rein est un organe excréteur qui, par le jeu de l'élimination ou de la conservation des composants du sang, joue de nombreuses fonctions dans l'organisme. Il participe ainsi à la formation de l'urine, l'épuration des déchets du métabolisme azoté, la régulation de la pression artérielle et de la volémie, le contrôle de l'équilibre acido-basique du milieu intérieur, le contrôle de la composition électrolytique des fluides circulants et des divers compartiments hydriques de l'organisme par voie endocrine. Les reins filtrent environ 180 litres de sang par jour pour produire 1,5 à 2 litres d'urine et sont donc les organes essentiels à la régulation et au contrôle de la composition interne de l'organisme.

### II.2/- Anatomie générale

Chaque rein mesure environ 10 cm de long, 5 cm de large et 3 cm d'épaisseur, et présente une face convexe et une face concave. Cette dernière constitue le hile par lequel les artères pénètrent dans le rein et d'où partent l'uretère



**Figure 4** . Anatomie du rein

et les veines (**figure 4a**). L'essentiel des données concernant l'anatomie du rein et la structure du néphron qui seront décrites dans ce chapitre proviennent des ouvrages de Dadoune (1990), Stevens (1992), Cross-mercier (1995) et Poirier (1997).

Au niveau structural, le rein est composé de deux zones distinctes : l'une superficielle, ou corticale (cortex); l'autre profonde, ou médullaire (medulla) qui fait saillie dans les voies excrétrices (**figure 4b**). Le cortex comprend une partie des néphrons, unités fonctionnelles du rein, et les tubes collecteurs formant de la sorte le labyrinthe et les irradiations médullaires connues sous le terme de pyramides de Ferrein. Le labyrinthe est composé des glomérules rénaux, des tubes contournés proximaux, des tubes contournés distaux et de la *macula densa*. Les pyramides de Ferrein, ou irradiations médullaires, sont quant à elles des extensions de la médullaire dans le cortex et constituent l'axe d'un lobule rénal. Elles comportent essentiellement les tubes collecteurs, la portion droite des tubules proximaux (la *pars recta*), la branche ascendante large de l'anse de Henlé et des vaisseaux sanguins.

La zone médullaire comprend 10 à 18 pyramides de Malpighi entre lesquelles se trouvent les colonnes de Bertin, dont chaque sommet est criblé de 15 à 20 canaux qui correspondent aux tubes de Bellini. Les pyramides de Malpighi comprennent les tubes collecteurs, la branche descendante, la portion grêle et la branche ascendante de l'anse de Henlé. On retrouve également au sein de la médullaire de nombreux vaisseaux sanguins formant les *vasa recta* et un tissu conjonctif discret : l'interstitium rénal. Les tubes de Bellini, dont la fonction est l'acheminement de l'urine néoformée dans les calices, puis le bassinnet et l'uretère, sont formés de plusieurs tubes collecteurs et se terminent au niveau des pores urinaires de l'*area cribosa*.

### **II.3/- Vascularisation du rein**

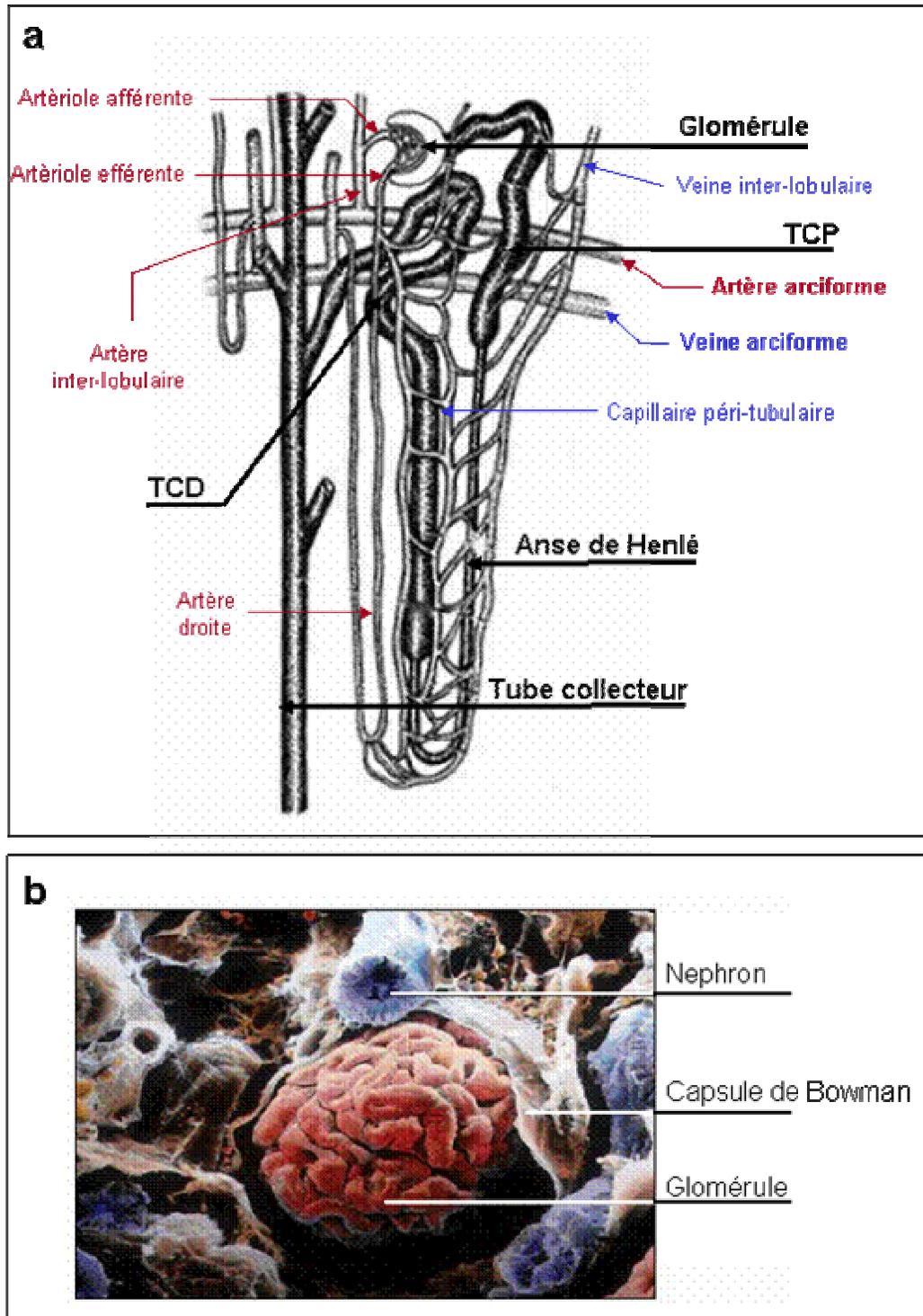
Pour comprendre le fonctionnement rénal, il est indispensable de connaître sa vascularisation, celle-ci étant directement impliquée dans les mécanismes de réabsorption tubulaire et par conséquent dans la formation de l'urine. Le débit sanguin de cet organe est par ailleurs très élevé, puisque, pour un poids total de 300g, les reins reçoivent environ 1.2 litres de sang par minute, soit près du quart du débit cardiaque.

Le réseau des artères rénales répond ainsi à la disposition des néphrons par une organisation singulière. Chaque rein est vascularisé par l'artère rénale, branche de l'aorte abdominale, qui se divise au niveau du hile en plusieurs branches pour former les artères lobaires, puis interlobaires dans le parenchyme rénal. Ces dernières cheminent entre deux pyramides de Malpighi, se divisent en artères arciformes, puis en artères interlobulaires qui pénètrent alors dans le labyrinthe, puis atteignent le cortex rénal (**figure 5a**). Au niveau de ces artères interlobulaires naissent de plus petits vaisseaux, les artérioles afférentes glomérulaires qui pénètrent dans les capsules de Bowman et se résolvent en un fin réseau capillaire, appelé glomérule (**figure 5a et 5b**).

Les artérioles efférentes glomérulaires drainent le glomérule, puis rejoignent soit le labyrinthe, formant ainsi un réseau de capillaires péri-tubulaires, soit la médullaire pour former les artères droites que l'on retrouve au niveau de la *vasa recta*. Quant aux labyrinthes et au cortex rénal, ces derniers sont drainés par les veines interlobulaires, qui se jettent par la suite dans les veines arciformes puis dans les veines interlobaires (**figure 5a**). Ces dernières rejoignent la veine rénale qui se jette finalement dans la veine cave inférieure.

#### **II.4/- Structure du rein**

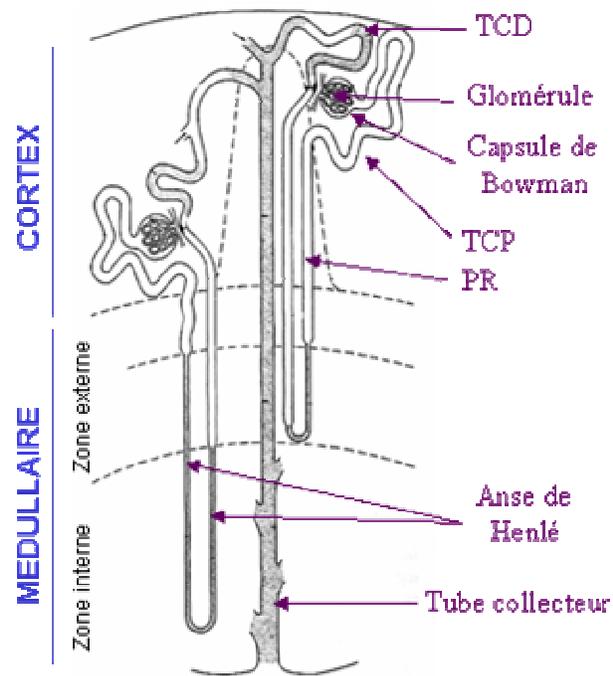
Chaque rein est constitué d'environ un million d'unités fonctionnelles de filtration, les néphrons ou tubes urinifères. Chacun d'entre eux est formé d'une structure capillaire, le glomérule, au travers de laquelle le sang est filtré pour constituer l'urine dite primitive, et d'une structure tubulaire au niveau de laquelle s'effectuent les processus de réabsorption et d'excrétion. Chaque néphron est ainsi successivement composé d'un corpuscule de Malpighi (glomérule), d'un tube contourné proximal, d'une branche descendante et ascendante de l'anse de Henlé, puis d'un tube contourné distal qui fait saillie vers le tube collecteur (**figure 6**). Chaque tube collecteur converge ensuite vers les calices, puis le bassinnet et débouche finalement sur l'uretère, ce dernier se déversant *in fine* dans la vessie.



**Figure 5** : Vascularisation du rein.

**(a)** Schéma représentant l'organisation vasculaire au niveau de chaque néphron. TCP : tubule contourné proximal, TCD : tubule contourné distal.

**(b)** Image obtenue par microscopie électronique à balayage d'un réseau capillaire glomérulaire.



**Figure 8 : Structure fonctionnelle du néphron.**

Le néphron correspond à l'unité fonctionnelle du rein et comprend : le glomérule, réseau de capillaires sanguins qui pénètre dans la capsule de Bowman ; le tubule contourné proximal (TCP), la pars recta (PR), les branches descendante et ascendante de l'anse de Henlé puis le tubule contourné distal (TCD) qui termine sa course dans le tubule collecteur.

## II.5/- Structure du néphron

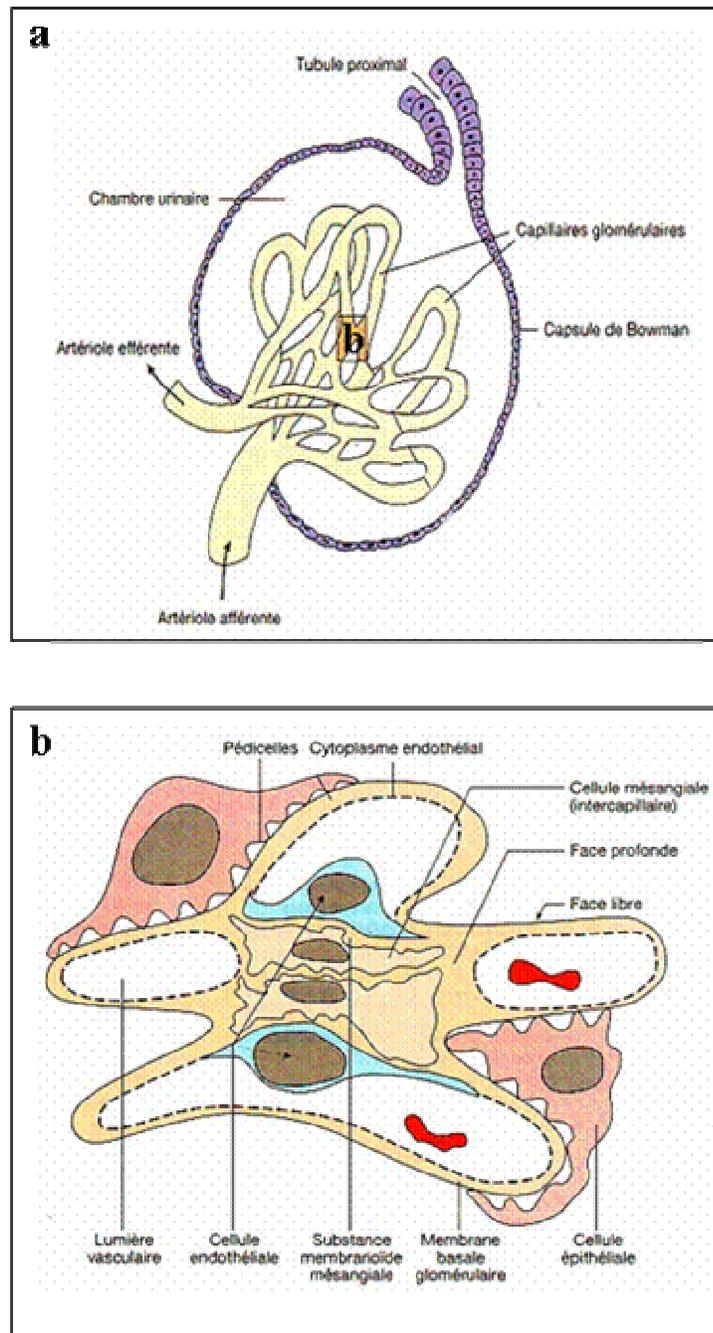
### II.5.1/- Le corpuscule rénal ou corpuscule de Malpighi

Le corpuscule rénal, de diamètre moyen de 175 à 200  $\mu\text{m}$ , est constitué du glomérule, de la capsule de Bowman et du *mésangium* (**figure 7a et 7b**). La capsule de Bowman correspond à la portion initiale du néphron et est caractérisée par une invagination renflée de l'extrémité du tube, dont le feuillet interne viscéral est constitué de cellules modifiées : les podocytes (**figure 8a**). Ces derniers émettent des prolongements cytoplasmiques majeurs qui se ramifient pour former de petites expansions, les pédicelles, accolées à la membrane basale du glomérule (**figure 8b**). Les pédicelles d'un podocyte alternent avec ceux d'un autre podocyte et forment ainsi des espaces de l'ordre de 20 à 30 nm qui sont traversés par les diaphragmes de la fente de filtration (**figure 8c**). Ces derniers sont des structures extracellulaires poreuses, épaisses de 4 nm, qui relient les pédicelles et sont importantes dans le maintien de la polarité des podocytes. Ces diaphragmes représentent la dernière barrière que le plasma rencontre après avoir traversé l'endothélium et la membrane basale glomérulaire.

L'endothélium de la fente de filtration glomérulaire est de type fenêtré et possède de larges pores dont le diamètre est de l'ordre de 75 nm. Cette membrane de filtration, située entre l'espace vasculaire et l'espace urinaire, est imperméable aux cellules et aux protéines de poids moléculaire élevé, mais est très perméable à l'eau et aux petites molécules en solution. La membrane basale glomérulaire, dont l'épaisseur varie de 250 et 300 nm, est composée de trois parties : la *lamina densa* centrale qui comprend les lames basales fusionnées des podocytes et de l'endothélium, la *lamina rara interna*, flanquée contre l'endothélium de la fente de filtration, et la *lamina rara externa* contre les podocytes.

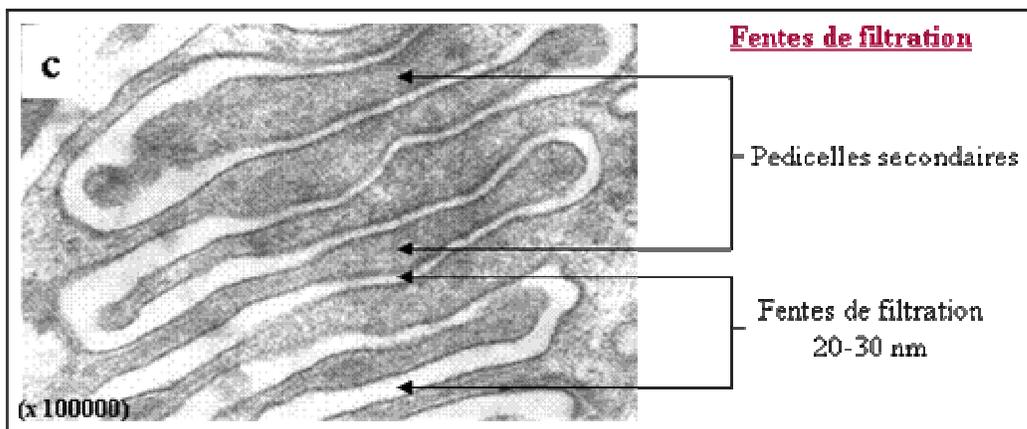
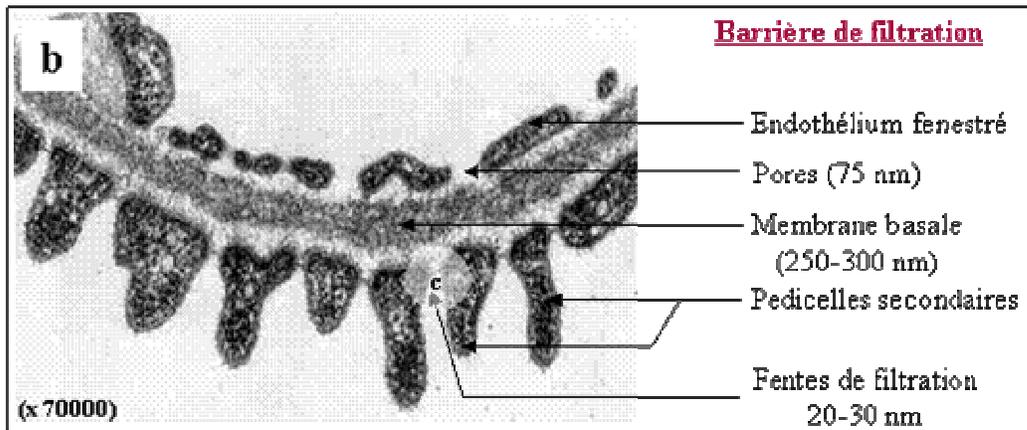
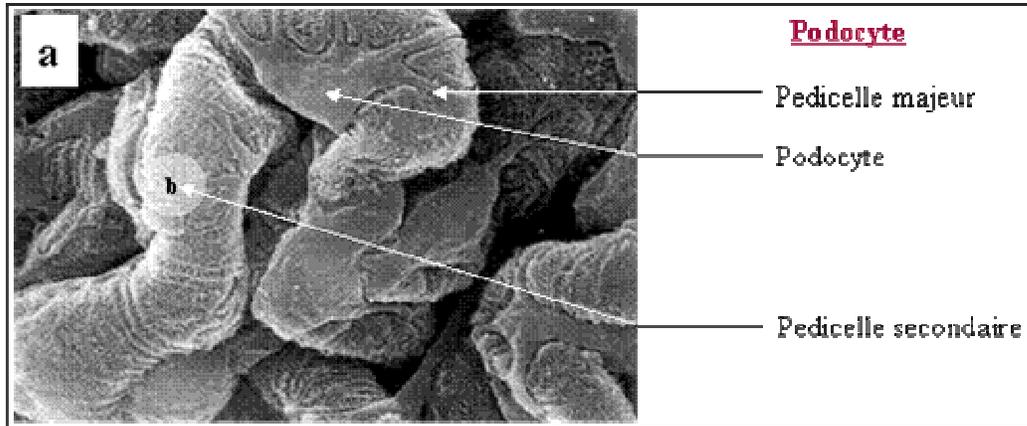
Le *mésangium* occupe la région centrale du glomérule et sert de charpente aux capillaires. Il est principalement composé de cellules mésangiales enrobées dans une matrice amorphe qu'elles élaborent, formant ainsi le tissu interstitiel qui est associé au glomérule. L'une des fonctions des cellules mésangiales est le maintien de l'intégrité de la membrane basale glomérulaire, et donc de la barrière de filtration, en phagocytant les composants vieillis et en maintenant son épaisseur. Les cellules

mésangiales régulent également le flux sanguin à travers le glomérule par



**Figure 7 : Le corpuscule rénal ou de Malpighi.**

Le corpuscule rénal est composé de la capsule de Bowman au sein de laquelle s'insère le réseau capillaire glomérulaire, ou glomérule (a). Le feuillet interne de la capsule de Bowman est constitué de cellules épithéliales modifiées : les podocytes (b)



**Figure 8 :** Podocyte (a), barrière de filtration capillaire glomérulaire (b) et fente de filtration (c).

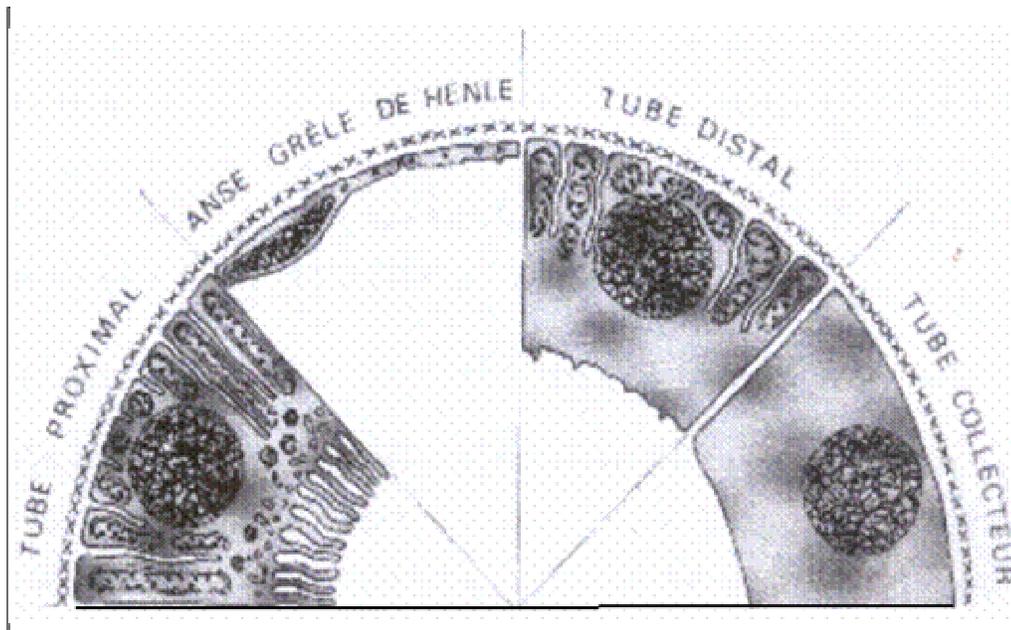
l'intermédiaire de leurs prolongements cellulaires, qui enveloppent les capillaires glomérulaires, lesquelles se contractent sous l'action de certaines hormones telle que l'angiotensine II.

### ***II.5.2/- Le tubule proximal (figure 9)***

Le tubule contourné proximal, de diamètre assez large chez l'homme (50 à 60  $\mu\text{m}$ ), fait suite à la chambre glomérulaire et commence par une partie contournée située dans la zone corticale du rein. Il est constitué d'un épithélium cubique simple qui possède sur sa face apicale de très nombreuses microvillosités. Celles-ci forment une bordure en brosse qui augmente considérablement la surface de contact et d'échange entre les cellules et la lumière tubulaire. Elles contiennent également de nombreuses enzymes, canaux et transporteurs qui sont impliqués dans la réabsorption tubulaire. Sur la face basolatérale de l'épithélium, la membrane plasmique forme de nombreux replis interdigités qui s'enchevêtrent avec celles des cellules voisines au niveau desquels sont situées de nombreuses mitochondries. L'ensemble donne un aspect strié en microscopie électronique à transmission. La partie droite (*pars recta*) du tubule proximal possède une structure semblable de celle du tubule contourné proximal, mais qui montre cependant une résorption de la structure en « bordure en brosse » à hauteur de la partie distale du tubule. D'après les critères morphologiques, le tubule proximal peut ainsi être subdivisé en 3 segments : le segment  $S_1$  qui correspond à la première partie du tubule contourné proximal et où les cellules sont plus volumineuses et les interdigitations plus nombreuses que celles des segments suivants ; le segment  $S_2$  qui comprend une portion du tubule contourné et une portion de la *pars recta* de ce même tubule ; enfin le segment  $S_3$  constitué par la partie distale de la *pars recta*.

### ***II.5.3/- L'anse de Henlé (figure 9)***

La branche descendante grêle des néphrons juxtamédullaires plonge dans la médullaire et s'étend jusqu'au sommet de la pyramide de Malpighi, où elle forme une épingle à cheveu et remonte vers le cortex pour former la branche ascendante de l'anse de Henlé (**figure 6**). Néanmoins, au sein d'un même rein, la longueur de l'anse varie d'un néphron à l'autre dans de larges proportions. Les néphrons superficiels ont, de façon générale, des anses courtes qui tournent dans la partie externe de la



**Figure 9** : Schéma de l'aspect en microscopie électronique de l'épithélium du tubule rénal.

médullaire, alors que les néphrons juxta-médullaires pénètrent profondément dans la médullaire interne (Jamison, 1973).

La portion descendante de l'anse de Henlé est constituée d'un épithélium pavimenteux simple, caractérisé par des cellules dont le type (I-IV) diffère selon leur degré de perméabilité à l'eau, la nature de leurs organites et la complexité de leurs jonctions serrées. Les cellules de type I sont présentes uniquement dans les néphrons moyens et superficiels, tandis que les cellules de type II, III et IV sont présentes dans les néphrons juxtamédullaires. La branche ascendante de l'anse de Henlé est quant à elle constituée par un épithélium cubique simple, semblable à celui que l'on retrouve au niveau du tubule contourné distal.

#### ***II.5.4/- Le tubule distal (figure 9)***

Le tubule distal débute au niveau de la partie droite de la branche ascendante de l'anse de Henlé (Morel *et al*, 1976 ; Morel, 1981). Il est délimité par des cellules cubiques, qui possèdent des replis membranaires au niveau du pôle basolatéral et des mitochondries associées à ces replis, mais ne possèdent pas de bordure en brosse. Les cellules du tube distal qui sont en contact avec l'artériole glomérulaire afférente (Dorup *et al*, 1992) et efférente sont différentes des autres cellules de ce même tubule. Elles sont étroites et hautes, et constituent la *macula densa*. Elles sont également en étroite relation avec les cellules mésangiales, les cellules juxtaglomérulaires des artérioles afférentes et efférentes glomérulaires, et forment ainsi l'appareil juxtaglomérulaire. Celui-ci, situé au pôle vasculaire de chaque corpuscule, est l'endroit où un feedback négatif permet d'ajuster et de contrôler la balance hydrosodée et la pression sanguine qui en dépend. Les cellules juxtaglomérulaires sont des cellules musculaires lisses modifiées de la paroi de l'artériole afférente d'où proviennent les capillaires glomérulaires. Elles sont d'abord des cellules endocrines et produisent une enzyme, la rénine, dont la sécrétion répond à une diminution de la concentration en sels, perçue d'abord dans la *macula densa*, et à une baisse de la pression sanguine, perçue dans la paroi de l'artériole afférente. La rénine induit alors une cascade de réactions qui conduisent *in fine* à une vasoconstriction glomérulaire et à une accélération de la réabsorption tubulaire des sels et de l'eau.

### **II.5.5/- Le tubule collecteur (figure 9)**

Les tubules collecteurs sont délimités par un épithélium cubique simple, aux jonctions bien définies et dépourvu de bordure en brosse. Il s'agit des parties droites terminales du néphron qui convergent pour former les tubes collecteurs qui transportent l'ultrafiltrat dans la dernière partie de son trajet à travers la médullaire hypertonique.

## **III/- Toxicité rénale de l'uranium**

### **III.1/- Doses critiques**

Il est généralement admis que des concentrations en uranium supérieures à  $0.5 \text{ mg.kg}^{-1}$  de poids corporel, et peut-être aussi faibles que  $0.01 \text{ mg.kg}^{-1}$  (Morrow, 1982), sont suffisantes pour induire un effet toxique rénal chez un très grand nombre d'espèces animales. D'après une compilation des données recueillies chez l'homme, il semblerait également que des concentrations en uranium comprises entre 2 et  $6 \mu\text{g.g}^{-1}$  de rein peuvent être accumulées sans pour autant induire d'effets néphrotoxiques sévères (Bernard, 1958). A partir de ces résultats, la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIRP) a adopté depuis 1959 une valeur de concentration maximale en uranium de  $3 \mu\text{g.g}^{-1}$  de rein (Spoor et Hursh, 1973). Bien que cela soit incertain, il semblerait cependant que cette concentration en uranium représente le seuil tissulaire qui correspondrait à une atteinte toxique rénale chez l'homme (Moss, 1989).

En revanche, dans les premiers jours qui suivent l'administration de concentrations beaucoup plus importantes d'uranium, de l'ordre de 6 à  $15 \text{ mg.kg}^{-1}$  de poids corporel, il est observé l'apparition d'une insuffisance rénale aiguë, suivie d'une insuffisance rénale chronique et enfin la mort des animaux contaminés (Haley, 1982 ; Domingo *et al*, 1987). Le degré de néphrotoxicité dépend de la dose et de la forme chimique administrée, de la voie de contamination, du régime alimentaire, de l'environnement, du sexe de l'animal et de l'espèce considérée (Hodge, 1973; Damon *et al*, 1986 ; Andrews et Bates, 1987). Par exemple, tandis que chez le rat la dose létale 50% ( $DL_{50}$ ), est comprise entre 2 et  $8 \text{ mg.kg}^{-1}$  lorsque l'uranium est administré par voie parentérale et que le régime alimentaire est normal (20% d'apport protéique) (Haley *et al*, 1982 ; Leach *et al*, 1984 ; Andrews et Bates, 1987),

celle-ci est 2 à 10 fois moins importante pour le cochon d'Inde, le lapin et le chien (Morrow *et al*, 1982 ; Leach *et al*, 1984).

### **III.2/- Physiopathologie associée à la néphrotoxicité de l'uranium**

L'atteinte toxique rénale engendrée par les métaux lourds, ainsi que par de nombreuses substances néphrotoxiques, se traduit généralement par une altération des processus de transport tubulaires rénaux. Par exemple, lors de l'induction de lésions rénales à la suite de l'administration d'uranium, le taux d'excrétion urinaire de la  $\beta_2$ -microglobuline est significativement augmenté (Evrin et Wibell, 1972 ; Buchet *et al*, 1980 ; Schentag et Plaut, 1980). Or, l'augmentation du taux d'excrétion de  $\beta_2$ -microglobuline dans les urines reflète une augmentation de sa production et une diminution de sa réabsorption au niveau de l'épithélium tubulaire proximale (Poulik et Gold, 1979). L'un des effets néphrotoxiques principal de l'uranium est donc une atteinte toxique de la partie tubulaire proximale du rein.

Cet effet au niveau tubulaire est confirmé par le fait que l'élévation du taux de  $\beta_2$ -microglobuline dans les urines s'accompagne d'une polyurie, et de manière générale d'un défaut de réabsorption tubulaire des protéines de bas poids moléculaire, mais aussi d'une glucosurie, d'une enzymurie, d'une augmentation du taux d'excrétion d'acides aminés, ainsi qu'à plus forte concentration en uranium, d'une albuminurie et d'une insuffisance rénale aiguë (Foulkes, 1971 ; Blantz *et al*, 1975 ; Morrow et Leach, 1981 ; Morrow *et al*, 1982 ; Hori *et al*, 1985 ; Zalups *et al*, 1988 ; Anthony *et al*, 1994 ; Pedrazza-Chaverri *et al*, 1995).

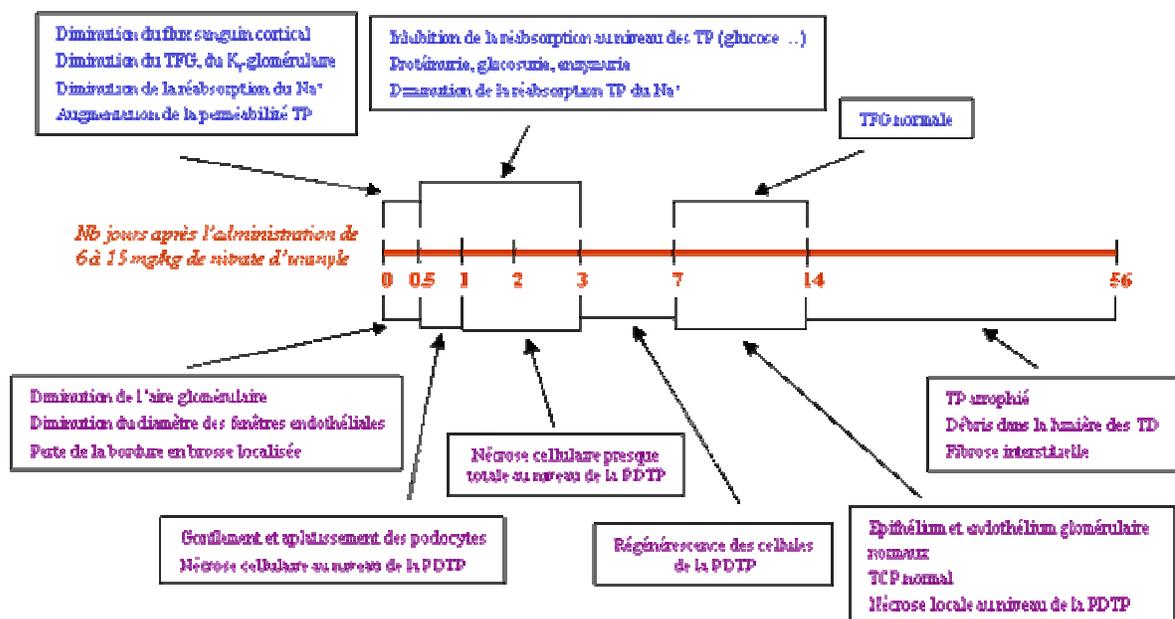
La néphrotoxicité induite par l'uranium ne se résume cependant pas à une simple atteinte des tubules proximaux. En effet, au regard de leurs travaux concernant la toxicité de l'uranium et le développement d'insuffisances rénales expérimentales chez l'animal, les auteurs ont rapidement été amenés à considérer qu'une exposition aiguë à l'uranium est également susceptible de produire des lésions glomérulaires (Hodge *et al*, 1973). Cette atteinte rénale glomérulaire se caractérise notamment par un défaut de perfusion, un défaut de filtration et l'apparition d'anomalies morphologiques. Ainsi, 2 heures après l'administration intraveineuse de 15 et 25 mg de nitrate d'uranyle par kg de poids corporel chez le rat, Blantz a noté une réduction respective du taux de filtration glomérulaire (TFG) de

53% et 79% (Blantz *et al*, 1975). D'après Tyrakowski, l'administration de 0.5 mg/kg d'acétate d'uranyle chez le chien conduit également à une diminution de 32% du TGF à 1 heure et de 36% à 2 heures (Tyrakowski *et al*, 1976). Plus récemment, 5 jours après l'injection sous-cutanée de 15 mg de nitrate d'uranyle par kg de poids corporel chez le rat, l'analyse histologique effectuée par microscopie électronique à transmission a révélé une altération ultrastructurale de l'épithélium et de l'endothélium des glomérules associée à une réduction progressive de la perméabilité glomérulaire (Pedraza-Chaverri, 1995). D'autres études montrent également que le TFG est réduit dans les 6 premières heures qui suivent l'administration de 6 à 9 mg.kg<sup>-1</sup> d'uranium, et demeure ainsi déprimé pendant les 48 premières heures (Flamenbaum, 1974).

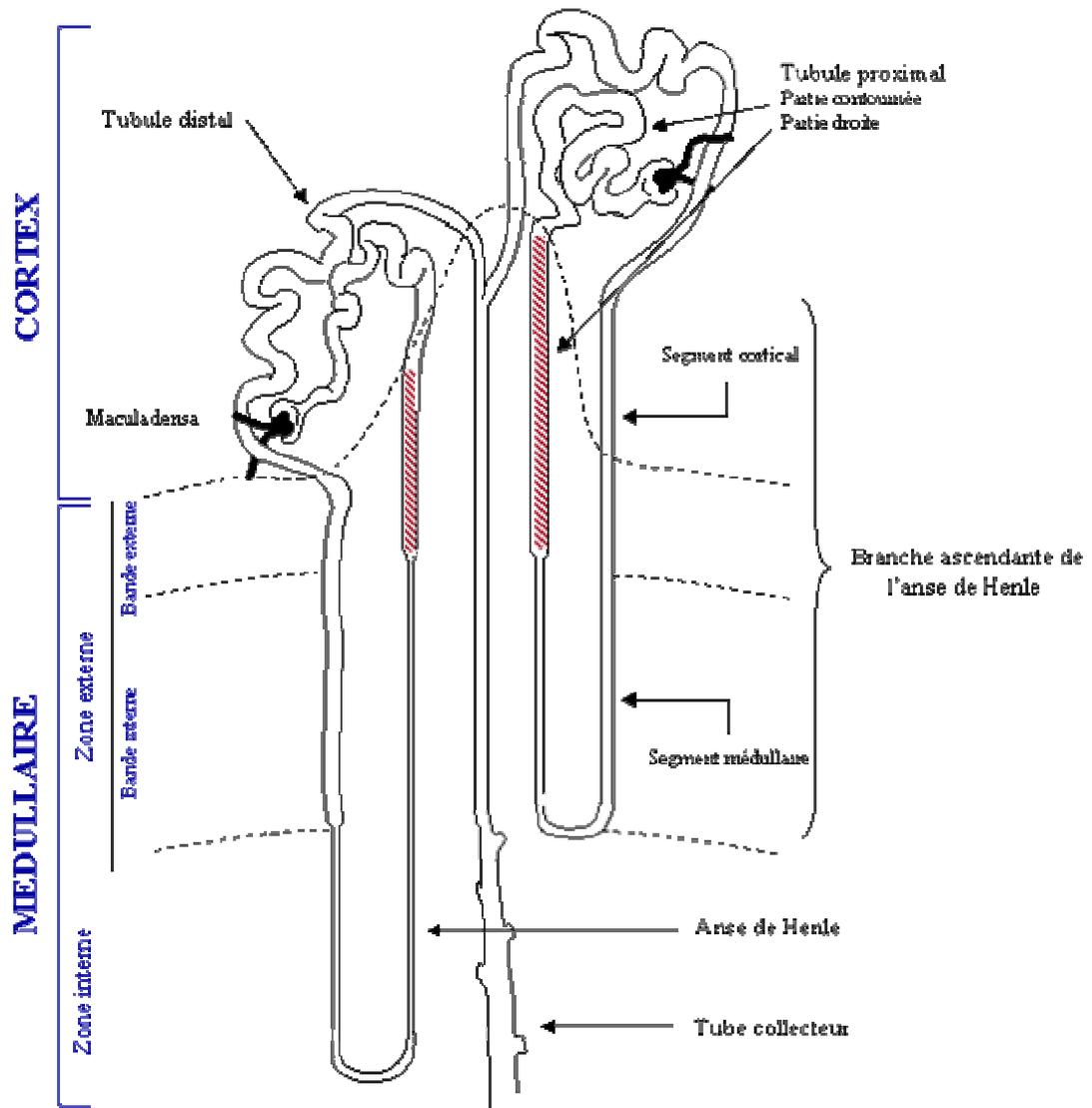
En résumé, la néphrotoxicité induite par l'uranium peut être divisée en 2 catégories : une atteinte glomérulaire dont la principale conséquence est une altération des processus de perfusion et de filtration ; et une atteinte tubulaire, qui se caractérise par une modification de la perméabilité membranaire et une perturbation des processus de transport transcellulaire. Un diagramme et une représentation schématique des changements morphologiques et fonctionnels occasionnés à la suite de l'injection parentérale de 6 à 15 mg de nitrate d'uranyle par kg de poids corporel chez le rat sont présentés dans les **figures 10 et 11**.

### **III.3/- Atteinte glomérulaire**

A ce jour, bien que les mécanismes précis impliqués dans les lésions glomérulaires induites par l'uranium soient encore peu connus, il est suggéré que cette atteinte toxique puisse avoir deux origines distinctes. La première peut être la conséquence d'un effet indirect de l'uranium, comme par exemple, l'altération par cet élément des systèmes de réabsorption tubulaire proximale, ou encore à la suite de l'obturation du flux tubulaire engendrée par la desquamation cellulaire. Dans ce dernier cas, cela conduirait à une réduction du flux plasmatique dans les capillaires glomérulaires, à l'émergence d'une augmentation de la pression hydrostatique intratubulaire et également à une rétrodiffusion tubulaire des solutés. La seconde origine peut être l'induction d'une altération fonctionnelle directe impliquant une



**Schéma 10 :** Cinétique d'apparition des principales altérations **morphologiques** et **fonctionnelles** après l'administration par voie parentérale de nitrate d'uranyle chez le rat. Les abréviations sont les suivantes : PDTP, partie droite du tubule proximal ; TD, tubule distal ; TCP, tubule contourné proximal ; TP, tubule proximal ; TFG, taux de filtration glomérulaire ;  $K_f$ , coefficient d'ultrafiltration glomérulaire ;  $Na^+$ , sodium.



**Figure 11** : Site principal de l'atteinte toxique rénale induite par l'uranium (surface hachurée en rouge). L'atteinte toxique se traduit par une réduction des systèmes de réabsorption tubulaire proximale (sodium, acides aminés, protéines ...) suivie d'une nécrose cellulaire qui débute au niveau de la partie droite (pars recta) du tubule proximal. A cela s'ajoute de façon moindre un effet glomérulaire. L'apparition d'anomalies structurales de l'épithélium et de l'endothélium des glomérules a été observée pour des doses en uranium supérieures à 6 mg/kg de poids corporel.

interaction de l'uranium avec les cellules glomérulaires. Il semblerait en fait que cette toxicité glomérulaire soit la conséquence d'une atteinte initiale des tubules proximaux, puis, dans les jours qui suivent l'administration d'uranium, de l'association d'une double atteinte, tubulaire et glomérulaire.

### ***III.2.1/- Altération indirecte des fonctions glomérulaires***

L'activation indirecte du système rénine-angiotensine, conduisant à une vasoconstriction glomérulaire, est certainement la cause de la diminution du TFG, et donc le mécanisme physiologique mis en jeu afin de contrebalancer l'augmentation de la pression hydrostatique intra-tubulaire induite par l'uranium (Nizet, 1981). Ce phénomène est confirmé par les résultats obtenus par Pedraza-Chavarri (1995). Dans son étude, l'injection sous-cutanée de  $15 \text{ mg.kg}^{-1}$  de nitrate d'uranyle chez le rat conduit effectivement très rapidement à l'apparition de lésions tubulaires proximales sévères, puis, au 5<sup>ème</sup> jour, à une altération structurale et fonctionnelle de l'épithélium et de l'endothélium glomérulaire. De manière intéressante, la comparaison de l'analyse biochimique urinaire et sanguine entre les animaux traités et non traités montre une augmentation précoce dans les urines de l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA), puis dans le sang au 5<sup>ème</sup> jour de l'expérimentation. L'ECA est responsable de la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II, elle même à l'origine de l'induction d'une vaso-constriction glomérulaire. Or, puisque le pré-traitement des animaux avec un inhibiteur de l'ECA atténue significativement les effets tardifs du nitrate d'uranyle sans pour autant empêcher l'induction des lésions tubulaires proximales (Blantz *et al*, 1985), il semblerait donc que l'élévation du taux d'excrétion urinaire de l'ECA soit consécutive à la toxicité tubulaire de l'uranium. La diminution du TFG, qui est observable seulement quelques jours après l'intoxication, serait consécutive à l'augmentation du taux sérique d'ECA, elle même induite par les lésions tubulaires provoquées par l'uranium.

### **III.2.2/- Modifications ultra-structurales induites par l'uranium**

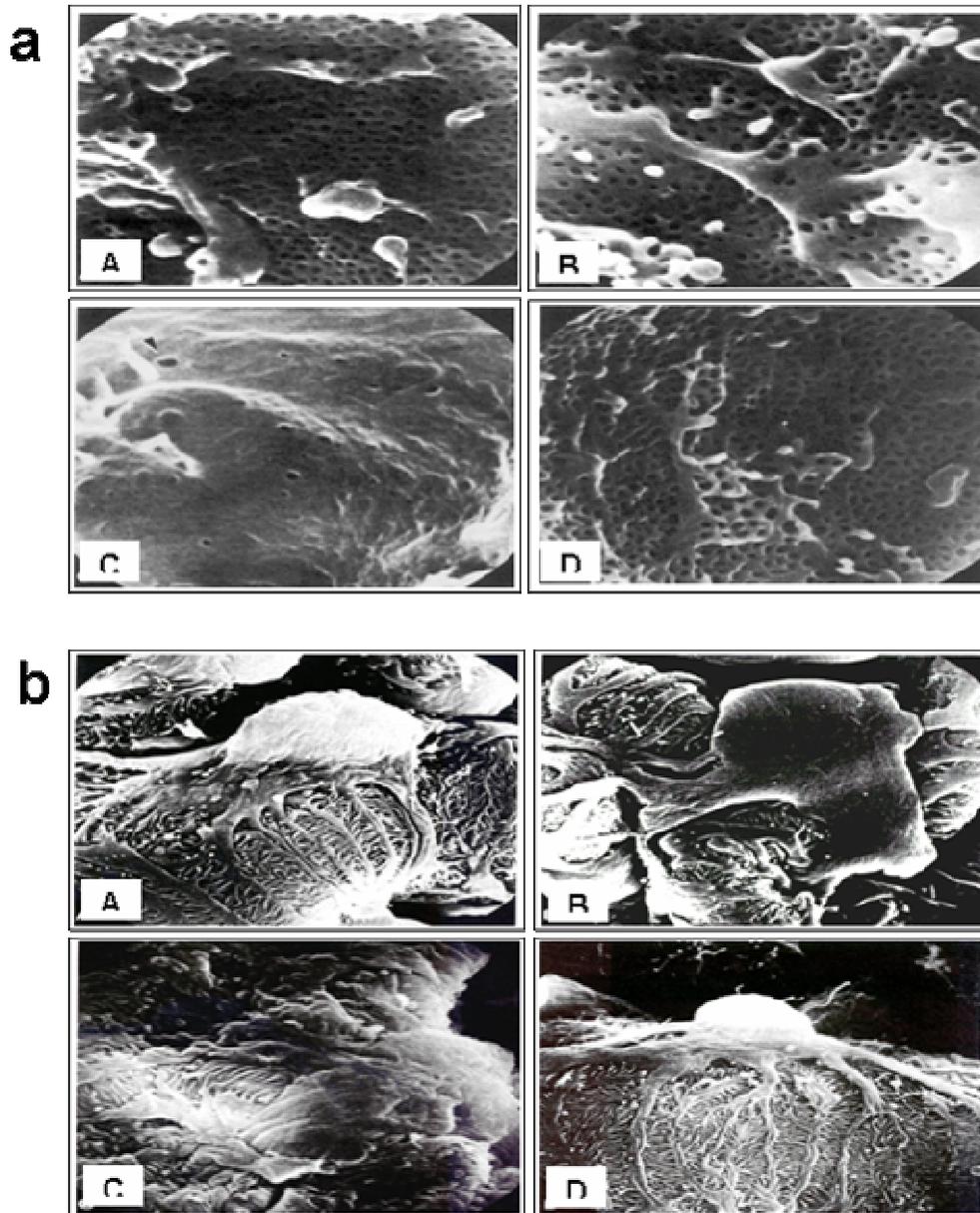
L'hypothèse d'une interaction directe entre l'uranium et les cellules glomérulaires repose sur les observations histologiques et ultra-structurales effectuées dans les jours qui suivent l'administration de fortes concentrations en uranium.

Il a par exemple été observé que l'administration sub-chronique de 20 mg de nitrate d'uranyle par jour et par voie orale chez le rat engendre au 15<sup>ème</sup> jour une modification structurale pathologique des glomérules caractérisée par un amincissement de leur taille et un rétrécissement du réseau des capillaires (Goel, 1980). Ces modifications sont définies au niveau ultrastructural par l'apparition d'une diminution de la densité et une réduction du diamètre des fentes de filtration endothéliales (**figure 12a**), associée à un aplatissement et un étalement des podocytes ainsi qu'à une disparition de leurs pédicelles (**figure 12b**) (Avasthi *et al*, 1980 ; Kobayashi *et al*, 1984 ; Moss, 1989 ; Kato *et al*, 1993). Plus récemment, des études morphométriques réalisées *in vitro* sur cultures primaires de cellules mésangiales, et sur glomérules isolés de rein de rat, confirment cette hypothèse d'interaction directe entre l'uranium et les cellules glomérulaires (Mirto *et al*, 1999b). Il a en effet été mis en évidence au cours de ces travaux que l'uranium est capable d'induire, de manière similaire à celle de l'angiotensine II, une vasoconstriction des des glomérules isolés et des cellules mésangiales.

### **III.4/- Atteinte tubulaire**

Les études d'intoxication aiguë et sub-chronique chez l'animal révèlent l'apparition d'un gonflement cellulaire, une hypertrophie vacuolaire et une perte des microvillosités de la bordure en brosse des cellules tubulaires proximales corticales.

Les lésions fonctionnelles deviennent évidentes dans les 2 heures qui suivent l'administration d'uranium et se traduisent, comme nous l'avons vu précédemment, par une polydipsie, une polyurie, une diminution de l'osmolarité urinaire et une altération des processus de réabsorption tubulaires (Diamond, 1989). Cette dernière est notamment à l'origine de la protéinurie, de l'enzymurie, de l'augmentation du taux d'excrétion d'acides aminés dans les urines ou encore de la diminution du taux de réabsorption des électrolytes contenus dans l'ultrafiltrat tubulaire. En outre, cette



**Figure 12** : Images obtenues par microscopie électronique à balayage (MEB) de la surface luminale du glomérule (a : x30000) et de cellules épithéliales glomérulaires (b : x6000) (Kobayashi et al, 1984). (A) Images obtenues à partir de glomérules non contaminés : on observe une structure épithéliale normale. (B) Quinze heures après l'injection d'acétate d'uranyle, on peut observer une réduction de la densité des fenêtres endothéliales de filtration (a), un aplatissement et un étalement du corps des cellules podocytaires (b). (C) Cinq jours après l'injection, la densité des fenêtres de filtration est encore plus réduite (a), les podocytes continuent de s'étaler et présentent certaines parties renflées avec une perte de l'interdigitation des pieds podocytaires (b). (D) Quatorze jours après l'injection, la surface luminale des capillaires glomérulaires (a) et la structure épithéliale (b) redeviennent normales.

atteinte tubulaire proximale, qui est directement proportionnelle à la dose d'uranium administrée, progresse pendant les premiers jours qui suivent l'intoxication, puis engendre une nécrose cellulaire. Cette nécrose débute au niveau du segment S3 de la *pars recta* proximale, situé à l'interface de la jonction cortico-médullaire et s'étend par la suite dans les deux sens de la lésion (Barnett et Metcalf, 1949 ; Haley, 1982 ; Mc Donald-Taylor, 1997; Sun *et al*, 2000 ; Sanchez *et al*, 2001).

## **IV/- Réabsorption, excrétion et toxicité tubulaire proximale de l'uranium**

### **IV.1/- Préambule**

En 1948 et 1951, les travaux de Barron et de Muntz, réalisés sur des levures, ont amené les auteurs à la conclusion que l'uranium ne traversait pas la membrane des levures, mais que celui-ci exerçait plutôt son action toxique par le développement d'une perturbation de l'état physico-chimique des membranes cellulaires (Muntz *et al*, 1951). En revanche, leurs travaux conduits sur différentes souches bactériennes les ont conduit à revoir leur hypothèse et suggérer que l'atteinte cellulaire générée par l'uranium serait non pas un effet membranaire, mais la conséquence d'une inhibition enzymatique intracellulaire. En utilisant une des souches bactériennes précédemment utilisée par Muntz et Barron, *P. aeruginosa*, Strandberg démontra en 1981 que cette dernière était capable d'accumuler très rapidement de fortes quantités d'uranium indépendamment du pH et de la température environnante (Strandberg *et al*, 1981).

Quelques temps plus tard, les études de microscopie électronique à transmission sur microcoupes de reins d'animaux contaminés avec différents composés d'uranium (Galle 1974 et 1982 ; Ghadially *et al*, 1982) montrèrent que ce dernier était précipité et accumulé sous la forme de complexes insolubles de phosphate d'uranyle au sein de structures cellulaires spécialisées : les lysosomes. Etant donné, qu'après instillation chez le rat de particules d'oxyde d'uranium (Hengé-Napoli *et al*, 1996), ce même type de précipités est également visible au sein des lysosomes des macrophages alvéolaires, il est maintenant proposé que le mécanisme cellulaire d'absorption de l'uranium est un processus endocytique. Cependant, bien que cette hypothèse semble aujourd'hui la plus probable, aucune

étude scientifique n'a été effectuée à notre connaissance afin de valider ou d'invalidier ce concept.

#### **IV.2/- Rôle des lysosomes dans l'accumulation et l'élimination de l'uranium**

Les lysosomes des cellules tubulaires proximales sont connus depuis plus de 2 décennies pour concentrer un grand nombre de métaux lourds, parmi lesquels on notera l'uranium, le mercure, le chrome, l'or ou encore le cuivre (Galle, 1974 ; Berry *et al*, 1978 ; Ghadially *et al*, 1982 ; Roth *et al*, 1984 ; Weinberg 1988 ; Berry *et al*, 1995 ; Floren *et al*, 2001). Ce mécanisme cellulaire de concentration ne semble cependant pas spécifique de l'épithélium rénal puisque, ce même type de stockage a également été mis en évidence dans certains autres types cellulaires (Stevens *et al*, 1980 ; Chassard-Bouchaud 1982, 1983 ; Ghadially *et al*, 1982). Il semble donc que ce mécanisme soit un processus cellulaire ubiquitaire de protection et de détoxification de l'organisme.

En ce qui concerne l'uranium, la localisation lysosomale a pu être déterminée grâce à l'analyse par émission X (Galle, 1974). Le spectre de rayons X émis par les inclusions lysosomales montre que la forme chimique sous laquelle est stocké cet élément correspond à un précipité de phosphate d'uranyle. La formation de ces matériaux denses aux électrons est très rapide, ceux-ci étant déjà observables 12 heures après l'injection de 10 mg de nitrate d'uranyle par kg de poids corporel chez le rat (Galle, 1974). Il s'ensuit alors une augmentation continue du nombre et de la taille des inclusions jusqu'au remplissage des lysosomes qui se caractérise par l'apparition d'une hypertrophie lysosomale.

#### **IV.3/- Autres sites potentiels d'accumulation de l'uranium**

Bien que les lysosomes représentent le site intracellulaire majeur d'accumulation de l'uranium, il semble toutefois que l'uranium soit également accumulé dans d'autres organites intracellulaires : notamment le noyau et les mitochondries.

### **IV.3.1/- Le noyau**

La présence d'uranium dans le noyau de cellules contaminées par l'uranium n'a jamais pu être mise en évidence par microscopie électronique à transmission couplée à l'analyseur X. Cependant, les travaux de Ghadially ont mis en évidence que les polyribosomes contenus dans le compartiment cytoplasmique sont remplacés par des monoribosomes quelques heures après l'injection d'acétate d'uranyle chez le lapin (Ghadially *et al*, 1982). D'après ces résultats, les auteurs suggèrent que ce phénomène est lié à une diminution de la production d'ARN messagers induite par l'interaction de l'uranium avec la chromatine nucléaire, ce qui laisse supposer que l'accumulation d'uranium dans le noyau est possible.

### **IV.3.2/- Les mitochondries**

Le rôle des mitochondries dans la concentration et l'accumulation d'un grand nombre de métaux, tel que le mercure, le plomb, l'aluminium ou encore l'or est connu depuis longtemps. Concernant l'uranium, il existe de nombreuses observations expérimentales qui laissent supposer que cet élément est également concentré par les mitochondries. Par exemple, Goodford et Wolowik ont observé, *in vitro* sur des cellules musculaires de cochon d'inde exposés à l'acétate d'uranyle, que l'uranium interagit de manière occasionnelle avec la membrane externe des mitochondries (Goodford et Wolowik, 1972). A cela s'ajoutent les travaux de Mollenhaur qui, une décennie plus tard, ont montré par microanalyse aux rayons X la présence d'uranium dans la matrice mitochondriale (Mollenhaur *et al*, 1986). Cependant, bien que ces résultats suggèrent que les mitochondries représentent un lieu secondaire d'accumulation de l'uranium, il n'a jamais été clairement défini au cours de ces travaux si les analyses avaient été effectuées sur des cellules endommagées ou des cellules viables.

## **IV.4/- Mécanismes de toxicité de l'uranium**

### **IV.4.1/- Toxicité membranaire de l'uranium**

L'acidification de l'urine primitive, qui s'effectue tout au long du tubule contourné proximal *via* l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  ATPase de type  $\text{NHE}_3$  et les pompes  $\text{H}^+$  ATPase, est à l'origine de la dissociation des complexes d'uranium contenus dans l'ultrafiltrat. Cette dissociation a ainsi pour effet d'accroître la charge rénale en ions uranyle, lesquels forment alors de nouvelles espèces chimiques avec les

composants de l'urine primitive, qui sont alors, soit éliminés dans les urines, soit associés réversiblement avec les membranes des cellules tubulaires (Dounce, 1949 ; Durbin, 1984). Or, l'une des propriétés communes à la plupart des agents néphrotoxiques est leur forte affinité pour les sites anioniques des membranes plasmiques (Simmons *et al*, 1981 ; Kirschbaum 1982 et 1984). Ainsi, bien que les sites membranaires de l'uranium ne soient pas encore connus à ce jour, il est généralement admis que ces derniers sont les groupements phosphate des lipides et des protéines constituant les membranes de la bordure en brosse (Bulman, 1980 ; Pasquale *et al*, 1986). Cela est d'autant plus probable que l'affinité apparente des ions uranyle pour les autres composants de la membrane cellulaire est relativement faible en comparaison de l'affinité apparente de ces mêmes ions pour le phosphate (Hu, 1972). D'autres auteurs suggèrent également l'existence d'une compétition d'homologie structurale entre les ions uranyle  $UO_2^{2+}$  et le calcium  $Ca^{2+}$  au niveau de ses sites de fixations (Lin-Shiau *et al*, 1979 ; Boileau *et al*, 1985).

Une telle interaction membranaire ne peut pas être sans effet sur la cellule, et occasionne notamment une perturbation de l'état physico-chimique de la bicouche lipidique. De manière intéressante, 48 heures après l'injection par voie intraveineuse de 5 mg d'acétate d'uranium par kg de poids corporel, l'atteinte tubulaire proximale et le taux de mortalité cellulaire sont tous deux fortement réduits lorsque les animaux sont traités par le diméthylthiourée (DMTU), un piègeur de radicaux libres (Kato *et al*, 1994). Ainsi, bien que l'uranium ne se combine pas aux groupements sulfhydryles du glutathion, connu pour jouer un rôle protecteur contre le stress oxydatif (Singer *et al*, 1951), l'analyse de ces résultats laisse cependant supposer que la toxicité de l'uranium provient, au moins en partie, d'une peroxydation lipidique. Or, puisque les phospholipides membranaires participent activement à la régulation de nombreuses fonctions cellulaires telles que l'endocytose, la transduction des signaux extracellulaires ou encore au maintien de l'activité des enzymes membranaires (Knauss *et al*, 1983 ; Weinberg, 1988), la perturbation du métabolisme des phospholipides pourrait donc être un élément précoce dans la pathogenèse associée à l'uranium (Leggett, 1989).

Par ailleurs, Cronin propose que la toxicité membranaire de l'uranium résulte de l'inhibition de l'activité de la phosphatase alcaline membranaire et d'une élévation

de la densité de phosphatidylinositol (PI) (Cronin *et al*, 1986). L'effet de l'uranium sur l'activité enzymatique est entièrement dépendant du pH environnant et se potentialise lorsque le pH est réduit de 7,4 à 5,5. La diminution du pH qui a lieu au cours du transit de l'urine primitive dans le tubule contourné proximal est donc susceptible d'accroître l'action toxique membranaire de l'uranium sur les cellules localisées dans la partie distale de cette région (Leggett, 1989). Or, puisque la diminution de l'activité de la phosphatase alcaline membranaire s'accompagne également d'un accroissement de son activité dans les urines (Yiule, 1973), cet effet paraît en partie associé à une perte substantielle des microvillosités des cellules tubulaires proximales. Parmi d'autres études, les travaux de Haley, conduits en 1982 sur le rat, abondent effectivement dans ce sens (Haley, 1982). Malgré cela, les résultats sont insuffisants pour déterminer avec exactitude si la mort cellulaire induite par l'uranium est liée à la perturbation de l'activité enzymatique membranaire, ou réciproquement, si l'inactivation de ces enzymes est le fruit de la nécrose cellulaire induite par l'intoxication.

#### ***IV.4.2/- Effet de l'uranium sur les lysosomes***

Les lysosomes contiennent un grand nombre d'enzymes hydrolytiques dont le rôle physiologique fondamental est la dégradation de protéines, d'acides nucléiques ou encore de cellules bactériennes. Or, comme nous l'avons déjà vu précédemment, les études de microscopie électronique à transmission couplée à l'analyse aux rayons X montrent que les lysosomes sont également les compartiments intracellulaires majeurs d'accumulation de l'uranium (Galle, 1974). A partir de cette observation, il est ainsi admis que ce mécanisme constitue un processus cellulaire de protection contre la toxicité de l'uranium en le concentrant sous une forme insoluble et en l'éliminant ultérieurement par exocytose dans la lumière tubulaire (Galle, 1974).

Cependant, puisque l'accumulation de l'uranium au sein de ces structures sous la forme de complexes insolubles de phosphate d'uranyle occasionne un accroissement de la masse lysosomale, puis une hypertrophie vacuolaire (Mc Donald-Taylor *et al*, 1997), il est probable que ce processus soit également impliqué dans la toxicité et la mort cellulaire induites par cet élément. Cette hypothèse est notamment étayée par les observations faites en microscopie électronique à

transmission qui révèlent, suite à l'hypertrophie, une destruction progressive de la membrane lysosomale. Ainsi, d'après les travaux de Galle (Galle, 1974), 48 heures après l'administration de 10 mg de nitrate d'uranyle chez le rat, les précipités présentent un diamètre de l'ordre de 2  $\mu\text{m}$  et sont observables à la fois dans les structures lysosomales, le cytoplasme des cellules viables et dans la lumière tubulaire proximale et distale. Ces observations ont conduit l'auteur à la conclusion que la désintégration de la membrane des lysosomes est à l'origine du déversement des enzymes hydrolytiques dans le cytoplasme et à la digestion cellulaire.

#### ***IV.4.3/- Effet de l'uranium sur les mitochondries***

La mitochondrie est le siège de la production d'énergie nécessaire au bon fonctionnement de la cellule qui s'effectue par des processus d'oxydation complète des glucides, des acides gras et des acides aminés. Ce processus enzymatique, encore appelé phosphorylation oxydative, est un mécanisme aérobie qui utilise l'oxygène ( $\text{O}_2$ ) pour réaliser la transformation des substrats en dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) et en eau ( $\text{H}_2\text{O}$ ). L'énergie produite à partir de cette transformation est alors stockée sous forme chimique dans l'adénosine triphosphate (ATP) qui est par la suite libérée dans l'espace cytoplasmique et utilisé par la cellule. L'ensemble de ces processus est connu sous le terme de respiration cellulaire dont l'activité peut être évaluée par la quantité d' $\text{O}_2$  consommé par la cellule.

L'altération des fonctions mitochondriales est une manifestation commune et souvent secondaire de l'atteinte toxique cellulaire générée par les métaux lourds (Galle, 1974; Choie et Richter, 1980 ; Bull, 1980; Weinberg, 1988). En ce qui concerne l'uranium, bien qu'il n'ait jamais été clairement démontré que la nécrose engendrée par cet élément puisse être la conséquence d'une perturbation des fonctions mitochondriales, il existe néanmoins certaines études qui suggèrent qu'un tel phénomène demeure fortement plausible. Il émerge en effet de ces études que l'évènement cytotoxique initial, obtenu pour des concentrations submillimolaires en uranium, est une inhibition progressive et sélective de certains processus enzymatiques impliqués dans la respiration cellulaire (Brady *et al*, 1989). A plus fortes concentrations, cette inhibition devient alors non sélective et se manifeste par l'inhibition de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (Brady *et al*, 1989) et par une vacuolisation

de l'espace intramitochondrial (Mueller et Mason, 1956 ; Haley, 1982; Lim *et al*, 1987 ; McDonald-Taylor *et al*, 1997).

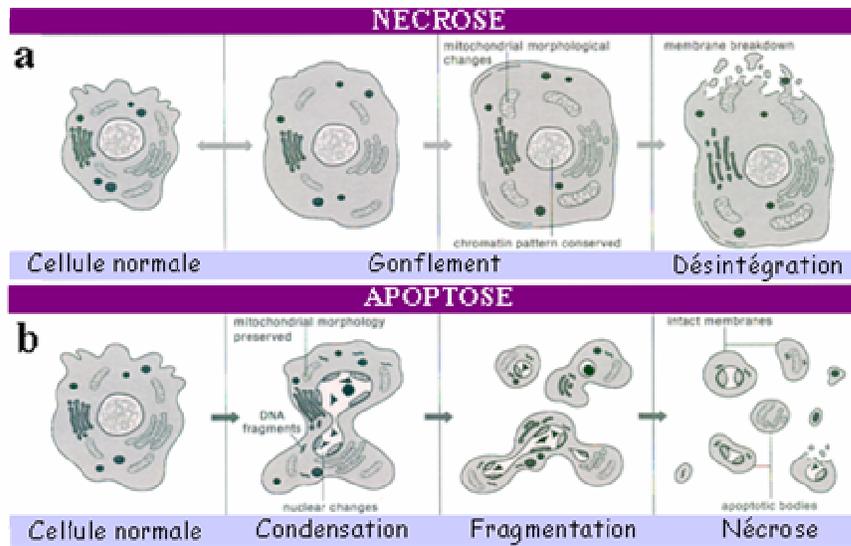
#### ***IV.4.4/- Mort cellulaire induite par l'uranium : nécrose ou apoptose ?***

##### ***IV.4.4.1/- La nécrose (figure 13a)***

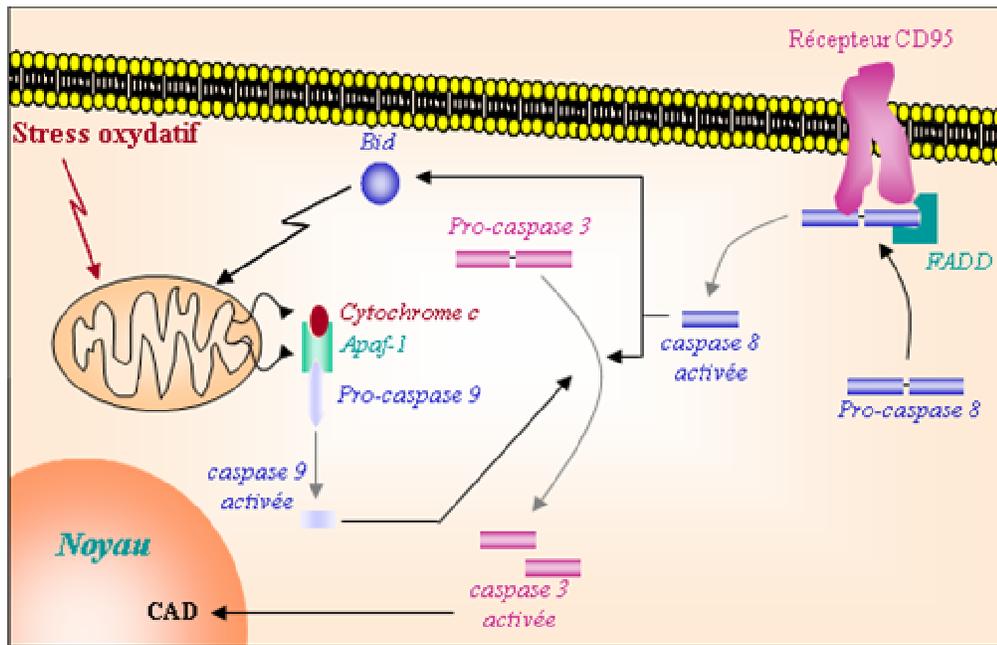
La nécrose, ou "mort cellulaire accidentelle", est un processus pathologique qui survient généralement lorsque les cellules sont exposées à un stress chimique ou physique sévère. La nécrose se caractérise par une lésion plus ou moins importante de la membrane plasmique et débute par une altération de l'homéostasie cellulaire. Cette dernière se traduit notamment par l'apparition d'un afflux d'eau et d'électrolytes extracellulaires dans l'espace cytoplasmique qui en retour engendre un gonflement général de la cellule, et plus particulièrement un gonflement des mitochondries. A terme, ce phénomène se caractérise par une rupture des membranes de la cellule et conduit au déversement du contenu cytoplasmique dans les fluides extracellulaires. *In vivo*, ce déversement est à l'origine de l'apparition de lésions tissulaires sévères, elles-mêmes généralement responsables d'une réponse inflammatoire importante.

##### ***IV.4.4.2/- L'apoptose (figures 13b et 14)***

L'apoptose, ou « mort cellulaire programmée », est en revanche un processus physiologique compliqué par lequel les cellules dites "indésirables", c'est-à-dire les cellules lésées et âgées, sont éliminées par l'intermédiaire de processus biologiques particuliers (Koseki *et al*, 1992 ; Coles *et al*, 1993). De manière générale, l'apoptose se caractérise par une agrégation de la chromatine, une condensation du noyau et du cytoplasme suivies par la formation de corps apoptotiques, chacun d'entre eux contenant une fraction d'ADN et une fraction des organites cellulaires (**figure 13b**). L'une des premières étapes de l'apoptose correspond à une modification de la composition de la membrane plasmique, dont l'un des principaux faits est la translocation de phosphatidyl sérine (PS) de la zone interne vers la zone externe de la bicouche lipidique. Au niveau moléculaire, il s'avère que l'ensemble de ces changements morphologiques est causé par l'activation d'une série de cystéines protéases, les caspases (Alnemri *et al*, 1996), qui peut avoir 2 origines (**figure 14**). La première provient de l'activation des récepteurs dits "de la mort", tels que les récepteurs CD95, et la seconde provient de l'altération des fonction physiologiques



**Figure 13** : Représentation schématique des deux modes de mort cellulaire : la nécrose (a) et l'apoptose (b).



**Figure 14** : Voies de signalisation intracellulaire impliquées dans le déclenchement de l'apoptose.

des mitochondries connues pour être les cibles centrales du stress oxydatif (pour une revue détaillée : Curtin *et al*, 2002).

Ainsi, la stimulation des récepteurs "de la mort" favorise la recrudescence de pro-caspases 8 à leur niveau par l'intermédiaire de protéines adaptatrices, les Fas-associated death domain proteins ou FADD, ce qui provoque leur activation par un procédé dit de proximité (Thornberry et Lezebnik, 1998 ; Green et Reed, 1998 ; Krammer, 2000). Une fois activée, la caspase 8 va alors d'une part activer la pro-caspase 3, qui joue un rôle central dans les processus apoptotiques, et d'autre part tronquer la protéine cytoplasmique Bid, qui à son tour va engendrer un stress mitochondrial. Ce dernier, qui peut également être induit par un stress oxydatif, engendre le relargage d'une série de molécules pro-apoptotiques dans le cytoplasme, parmi lesquels Apaf-1 et le cytochrome c contribuent à la formation des apoptosomes (Apaf-1 / cytochrome c / pro-caspase 9). Ces apoptosomes conduisent alors à l'activation de la pro-caspase 9 (Li *et al*, 1997 ; Zou *et al*, 1997 ; Salvesen, 1999 ; Kroemer et Reed, 2000) qui active à son tour la caspase 3. Il en résulte *in fine* l'activation d'une endonucléase  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  dépendante, la Caspase-activated Dnase (CAD) qui existe à l'état naturel sous la forme d'un complexe inactif (Nagata, 2000). L'activation de cette dernière est alors responsable de la coupure de l'ADN en fragment de 180 paires de bases.

#### IV.4.4.3/- Uranium et mort cellulaire

Une autre des propriétés communes aux métaux lourds est l'induction d'un stress cellulaire qui peut conduire à la mort de la cellule soit par apoptose, soit par nécrose, en fonction de l'intensité de l'intoxication (Nosseri *et al*, 1994 ; Vayssier *et al*, 1998). Comme nous l'avons déjà vu précédemment, l'atteinte tubulaire induite par l'uranium se caractérise, pour des doses suffisamment importantes, par une manifestation clinique de dégénérescence cellulaire qui prend naissance au niveau de la *pars recta* des tubules proximaux. A ce stade, bien que les nombreuses données de la littérature fassent référence à l'induction d'une nécrose, certaines preuves récentes suggèrent néanmoins que l'apoptose participe, au moins en partie, activement dans les processus de mort cellulaire induite par l'uranium (Sano *et al*, 1998 et 2000). Cela est d'autant plus pertinent que le taux d'expression de HSP73, un membre de la superfamille des "Heat Shock Proteins" (HSPs), est stimulé après

une première contamination par l'uranium chez le rat (Huzino *et al*, 1997). L'une des propriétés des métaux lourds est en effet leur capacité à induire une réponse cellulaire qui est caractérisée par la synthèse et l'accumulation d'HSPs (Lindquist et Craig, 1988). Parmi celles-ci, HSP70, qui regroupe HSP72 et HSP73, est en outre un facteur anti-apoptotique qui séquestre le facteur pro-apoptotique Apaf-1, et donc empêche le recrutement de la pro-caspase 9 vers l'apoptosome (Beere *et al*, 2000 ; Saleh *et al*, 2000).

#### **IV.4.5/- Résistance acquise**

Quelle que soit le type de mort cellulaire induit, les animaux survivant aux fortes doses d'uranium montrent par la suite une régénérescence complète de l'épithélium tubulaire. Au cours de ce processus physiologique de régénérescence, les cellules lésées sont remplacées par de nouvelles cellules atypiques (Hodge *et al*, 1973), plus courtes que les cellules initiales, avec peu de microvillosités et dont la composition interne se caractérise notamment par une réduction du nombre de mitochondries. L'épithélium tubulaire proximal ainsi régénéré devient alors résistant à une nouvelle intoxication par l'uranium (Hodge *et al*, 1973 ; Sano *et al*, 1998) et a amené les auteurs à suggérer que cette résistance acquise est directement associée à la perte substantielle des microvillosités des membranes de la bordure en brosse. Or, récemment, les travaux *in vitro* de Furuya, concernant la toxicité de l'uranium, indiquent que la tolérance acquise à la suite d'une première intoxication des cellules LLC-PK<sub>1</sub> partage le même processus cellulaire que celui qui est impliqué dans la thermo-tolérance : la stimulation de l'expression des protéines HSPs (Furuya, 1997). Les HSPs font partie de la superfamille des protéines dites "protéines de stress" et sont fortement exprimées en réponse au stress thermique et oxydatif, mais aussi en réponse à la néphrotoxicité induite par les métaux lourds (Komatsuda *et al*, 1999). Au cours de telles "attaques" cellulaires, les HSPs sont, entre autre, responsables de la réparation ou de la dégradation des protéines dénaturées (Pelham, 1986 ; Hightower, 1991 ; Benjamin et McMillan, 1998). Huzino suggère que l'augmentation du taux rénal de HSP73, observée après une première contamination des rats par l'uranium, est directement liée à la résistance acquise par les cellules tubulaires proximales lors d'une seconde intoxication (Huzino *et al*, 1997).

#### **IV.4.6 /- Modèles de toxicité cellulaire**

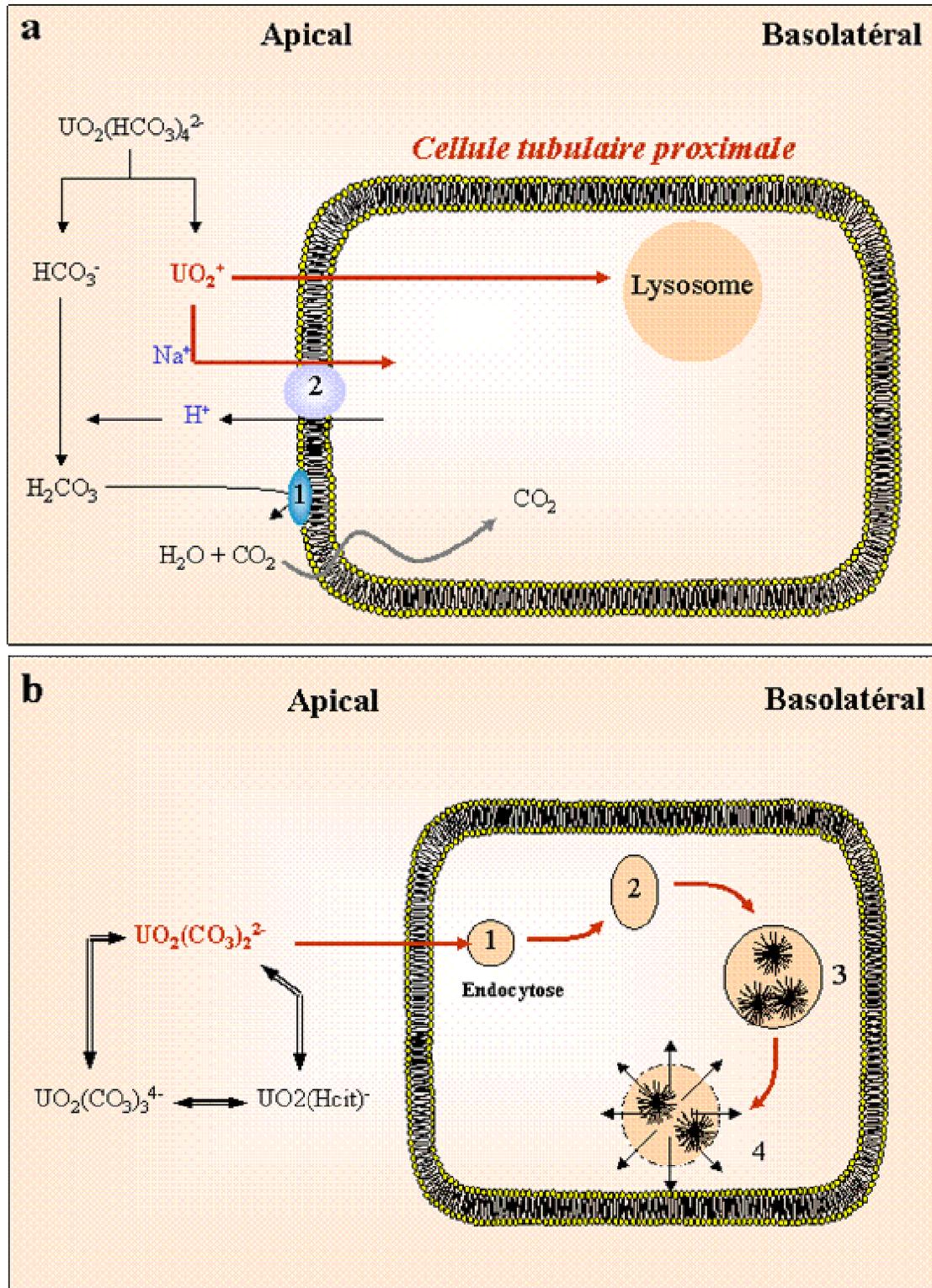
Bien qu'il existe un grand nombre d'études concernant la néphrotoxicité de l'uranium, les processus cellulaires responsables de la réabsorption et de la toxicité tubulaire proximale de cet élément demeurent imprécis et incomplets. A ce jour, il existe néanmoins 2 modèles de toxicité cellulaire, dont l'un repose sur une approche expérimentale *in vivo*, et l'autre sur une double approche, expérimentale *in vitro* et théorique de répartition des espèces chimiques de l'uranium dans le milieu extracellulaire.

##### *IV.4.6.1/-Modèle de Pasquier*

D'après ce modèle de toxicité, élaboré à partir de l'étude de l'efficacité de l'acétazolamide, un inhibiteur de l'anhydrase carbonique, sur la néphrotoxicité de l'uranium, Pasquier suggère que cette dernière est indirectement associée au processus de réabsorption tubulaire proximale des bicarbonates (**fig 15a** : Pasquier et al, 1979). Il propose que l'uranium est dans un premier temps filtré au niveau glomérulaire sous la forme d'un complexe carbonato  $[\text{UO}_2(\text{HCO}_3)_4^{2-}]$ , qui se dissocie par la suite sous l'influence du pH urinaire dans le tube contourné proximal et conduit à la libération dans l'urine primitive d'ions uranyles ( $\text{UO}_2^{2+}$ ) et de bicarbonate. D'après son hypothèse, tandis que les ions bicarbonate seraient alors réabsorbés par un processus de diffusion passive sous la forme de  $\text{CO}_2$  dissout au niveau de la membrane apicale, les ions uranyle seraient quant à eux réabsorbés soit par un mécanisme endocytaire, après liaison aux phosphoprotéines membranaires, soit par compétition avec le sodium au niveau de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  ATPase de type  $\text{NHE}_3$ . L'uranium, ainsi réabsorbé par endocytose, précipiterait au sein des lysosomes de manière pH-dépendante, et, une fois la capacité de stockage lysosomale dépassée, conduirait à une hypertrophie vacuolaire, puis une nécrose cellulaire.

##### *IV.4.6.2/- Modèle de Mirto*

Plus récemment, les travaux conduits sur la lignée cellulaire LLC-PK<sub>1</sub> en culture, d'origine tubulaire proximale de rein de porc, ont permis de mettre en évidence l'importance de la spéciation de l'uranium dans le milieu extracellulaire vis à vis de la toxicité induite par cet élément (Mirto *et al*, 1999). En effet, tandis que la



**Figure 15** : Modèles de toxicité cellulaire induite par l'uranium.  
(a) Le modèle de Pasquier, (b) le modèle de Mirto.

mise en solution d'uranium dans un milieu contenant un excès d'ions citrate n'a pas engendré d'effet cytotoxique détectable, en revanche, sa mise en solution dans un milieu physiologique en présence d'ions bicarbonate a provoqué une cytotoxicité directement dépendante de la concentration en uranium et du temps d'incubation. L'analyse de répartition des espèces chimiques en solution, à partir des données thermodynamiques, a amené les auteurs à supposer que l'espèce chimique cytotoxique de l'uranium serait le complexe bicarbonato  $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$ .

Dans ce modèle, Mirto suggère ainsi que l'uranium serait réabsorbé par un processus endocytique, vraisemblablement à la suite d'une interaction avec les protéines membranaires sous la forme d'un complexe bicarbonato (**figure 15b**). Puis, de manière identique au modèle proposé par Pasquier, la fusion des vésicules endocytiques avec les endosomes primaires puis secondaires, suivie de la fusion des endosomes secondaires avec les lysosomes primaires contenant les hydrolases acides conduirait à la précipitation pH dépendante de l'uranium sous la forme de microcristaux insolubles de phosphate d'uranyle au sein des lysosomes. La formation de ces structures serait alors responsable, pour de fortes concentrations en uranium, de l'hypertrophie lysosomale, et conduirait à la rupture de leur membrane, au déversement des hydrolases acides dans le cytoplasme et enfin à la mort de la cellule.

#### **IV.5/- Hypothèses de travail**

A ce jour, bien qu'il existe un grand nombre d'études histopathologiques et fonctionnelles concernant la néphrotoxicité rénale de l'uranium, aucune d'entre elles ne permet cependant de définir avec certitude et précision le ou les mécanismes impliqué(s) dans la réabsorption tubulaire proximale et sa toxicité. Or, comme on retrouve *in fine* l'uranium précipité sous la forme de microcristaux de phosphate d'uranyle au sein des lysosomes des cellules tubulaires, il semble donc que l'endocytose joue un rôle crucial dans le mécanisme de réabsorption de cet élément. Nous avons donc dans un premier temps cherché à valider ou invalider cette hypothèse de travail, en se basant sur un modèle d'endocytose clathrine-dépendante. Les raisons d'un tel choix reposent sur le critère que ce type d'endocytose est un processus cellulaire constitutif, contrairement à l'endocytose cavéoline-dépendante et à la macropinocytose, et le mécanisme endocytique le

mieux caractérisé à ce jour. Les résultats obtenus à partir de nos études préliminaires nous ont alors conduit à considérer l'implication d'un second mécanisme de transport membranaire, réalisé par les co-transporteurs NaPi, qui régulent *in vivo* la réabsorption tubulaire proximale du phosphate sous l'influence d'un gradient électrochimique en sodium. Les chapitres III et IV de cette partie bibliographique seront donc respectivement consacrés à la description de l'endocytose et du mécanisme de transport transmembranaire du phosphate *via* les cotransporteurs de type NaPi.

## **L'ENDOCYTOSE**

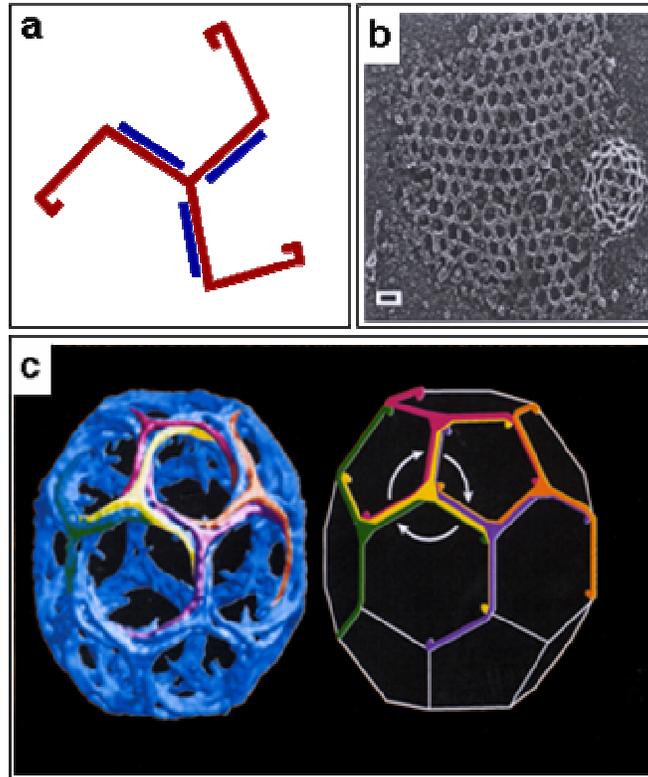
### **I/- Généralité**

L'endocytose est un processus cellulaire complexe, développé par les cellules eucaryotes afin d'internaliser des substances extracellulaires de plus ou moins petite taille. Selon la taille des particules absorbées par les cellules et les mécanismes intracellulaires mis en jeu, il est ainsi possible de discerner plusieurs types d'endocytose. Ainsi, en fonction de la taille des particules, il est possible de distinguer, d'une part la phagocytose (absorption de cellules, bactéries...), que l'on retrouve uniquement au niveau des cellules spécialisées (les cellules de la microglie, les macrophages, les monocytes ...), et d'autre part la pinocytose (absorption de protéines solubles, récepteurs, hormones...). Selon les mécanismes cellulaires impliqués, cette dernière peut elle-même être subdivisée en sous-groupes : l'endocytose clathrine-dépendante, l'endocytose caveoline-dépendante, la macropinocytose et l'endocytose en phase fluide (FPE).

L'endocytose joue ainsi un rôle fondamental dans plusieurs fonctions cellulaires, parmi lesquelles l'absorption d'éléments nutritifs, la régulation de l'activité membranaire des récepteurs et des multiples systèmes de transport, l'homéostasie du cholestérol cellulaire, le maintien de la polarité cellulaire et bien d'autres processus encore. Notons également que les processus endocytiques représentent le mécanisme d'absorption de nombreux éléments pathogènes pour l'organisme, tels que certains virus et certaines toxines.

### **II/- L'endocytose clathrine-dépendante**

Découverte en 1964 par Roth et Porter, l'endocytose clathrine-dépendante est aujourd'hui le processus endocytique le mieux caractérisé que l'on retrouve dans toutes les cellules nucléées, allant de la levure à l'Homme. Il s'agit d'un processus complexe qui fait intervenir un grand nombre de facteurs de régulation et de protéines adaptatrices, dont la principale est la clathrine (Pearse, 1976), également



**Figure 16** . La clathrine et la cage de clathrine.

La clathrine est composée de 3 chaînes lourdes de 190 kDa, formant un triskelion au centre duquel sont insérées 3 chaînes légères de 25 kDa (a) Lors du bourgeonnement des vésicules d'endocytose tapissées de clathrine (b), les images obtenues par microscopie électronique à transmission (b) et par résonance magnétique nucléaire (c), montrent que la charpente vésiculaire est composée d'un assemblage hautement ordonné, dont la structure correspond à une succession de motifs pentagonaux et hexagonaux.

connue sous le nom de triskelion. La clathrine est en effet la protéine charnière de ce processus endocytique. Son assemblage sur la face cytoplasmique de la membrane est à l'origine de la formation d'une « cage » ; il se forme ainsi des invaginations intra-cytoplasmiques tapissées de clathrine, qui se détacheront par la suite de la membrane pour fusionner avec des compartiments intracellulaires spécifiques.

Or, puisque l'endocytose est un processus cellulaire complexe, faisant intervenir un très grand nombre de facteurs de régulation dont les fonctions sont parfois diverses et ne sont pas toujours bien définies, nous ne détaillerons au cours de ce paragraphe que les principaux mécanismes et les processus les mieux caractérisés.

## **II.1/- Principaux déterminants moléculaires**

### ***II.1.1/- La clathrine et les cages de clathrine***

La clathrine est une protéine cytoplasmique présente sous la forme d'une étoile à trois branches, appelée triskelion. Chacune de ces branches est composée d'un assemblage d'une chaîne légère de 25 kDa et d'une chaîne lourde de 190 kDa (**figure 16a**), au niveau de laquelle se situent les zones d'interaction protéine-protéine. Les études en résonance magnétique nucléaire (RMN) et microscopie électronique à transmission (MET) montrent la présence d'une structure très ordonnée correspondant à une succession de motifs pentagonaux et hexagonaux (**figure 16b et 16c**). La formation de ces cages de clathrine fait intervenir un grand nombre de facteurs de régulation tels que l'auxiline, l'amphyphysine, l'AP-180, l'endophiline ou encore la dynamine (Damke, 1996). La clathrine interagit également directement avec des protéines adaptatrices dont les principales sont les protéines adaptatrices AP-2 (Kirchhausen *et al*, 1997 ; Hirst et Robinson, 1998 ; Kirchhausen, 1999), les  $\beta$ -arrestines et l'ubiquitine.

### ***II.1.2/- Les protéines adaptatrices***

Les protéines adaptatrices de type AP sont des complexes hétérotétramériques, découvertes en 1979 par Keen (Keen *et al*, 1979), et sont en partie responsables du recrutement et de l'orientation intracellulaire des substances endocytés. Il existe à ce jour 2 grandes classes de complexes hétérotétramériques : le premier, AP-1, qui est préférentiellement localisé au niveau du réseau trans-

golgien (TGN), et le second, AP-2, qui est principalement exprimé au niveau de la membrane plasmique. Tandis que le premier type de complexe hétérotétramérique est impliqué dans la régulation du transfert des protéines entre le TGN et les lysosomes et/ou les endosomes, le second type est responsable de l'orientation des substances endocytées au niveau de la surface des cellules.

Dans la majorité des cas, l'information déterminant l'orientation des molécules endocytées est contenue au niveau d'un de leur domaine cytoplasmique, généralement composé de 4 à 6 acides aminés. Ainsi, la reconnaissance d'un signal particulier de type  $-Yxx\phi-$  et  $-FxNPxY-$  (ou Y une tyrosine, x un résidu polaire ou chargé positivement,  $\phi$  est un résidu comportant une chaîne hydrophobe, F une phénylalanine, N une asparagine et P une proline) (Ohno *et al*, 1995) ou encore de type dileucine  $-LL-$  (Kirchhausen, 2000) par le domaine C-terminal d'un des monomères constituant le complexe AP-2 provoque l'orientation de la molécule vers les puits tapissés de clathrine. Ces protéines adaptatrices possèdent également dans leur séquence primaire de nombreux domaines caractéristiques, responsables de leur interaction avec d'autres protéines spécifiques telles que l'amphysine, l'AP180, l'auxiline, l'EPS15 et l'AAK, toutes impliquées dans la régulation, la génèse et le désassemblage de la charpente de clathrine. AP-2 représente ainsi une plateforme moléculaire d'interaction protéine-protéine.

Les  $\beta$ -arrestines et l'ubiquitine sont quant à elles deux autres classes de protéines adaptatrices, interagissant avec certains domaines peptidiques spécifiques de certaines protéines, riches en résidus phosphorylés (tyrosine et sérine), et participent au transfert de ces protéines vers les puits tapissés de clathrine. Cependant, tandis que l'ubiquitine semble réguler l'endocytose et le transport d'un grand nombre de protéines membranaires, en revanche, la  $\beta$ -arrestine semble être un partenaire spécifiquement associé à la rétrorégulation négative et à la désensibilisation des récepteurs couplés aux protéine G : les RCPGs.

## **II.2/- Modèle d'endocytose clathrine-dépendante**

D'une manière générale, l'endocytose clathrine-dépendante est un mécanisme qui peut être décrit comme une succession d'étapes, s'échelonnant de

l'assemblage au désassemblage de la charpente de clathrine (**figure 17**). La première étape correspond à la nucléation et à l'initiation des puits tapissés de clathrine qui s'accompagne d'une concentration à son niveau (recrutement) des molécules extracellulaires devant être endocytées (cargos); la seconde à la structuration du tapis de clathrine autour des vésicules en formation; la troisième au bourgeonnement des vésicules; et enfin, la quatrième au désassemblage de la charpente des vésicules, suivi du transfert de leur contenu vers les compartiments endosomaux.

### ***II.2.1/- Recrutement des cargos et initiation de la formation des puits tapissés de clathrine***

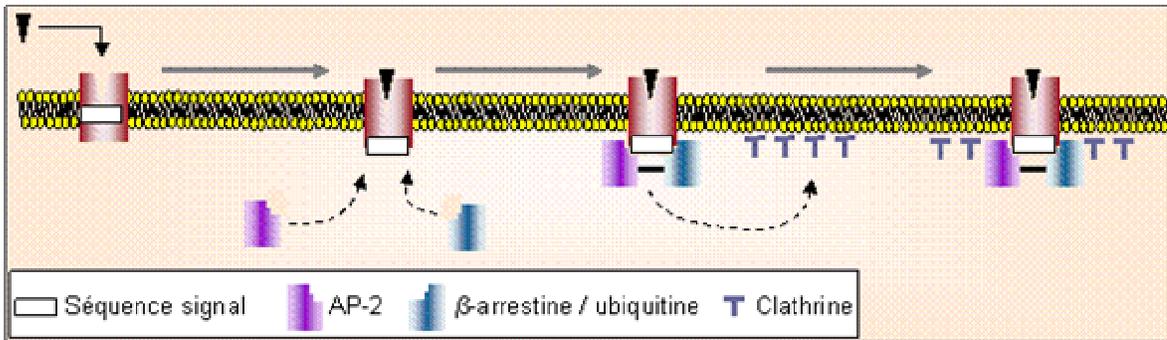
L'initiation de l'endocytose clathrine-dépendante figurée dans la **première étape de la figure 17** correspond soit à la liaison d'un ligand extracellulaire avec une protéine membranaire spécifique appelée récepteur; soit à la (dé)phosphorylation d'une protéine membranaire au niveau d'un ou de plusieurs de ses sites consensus de phosphorylation; ou à un changement de conformation de la protéine devant être internalisée. Cette modification induit une interaction avec certains facteurs intracellulaires impliqués dans le déclenchement du processus endocytique. Cependant, quel que soit les processus déclenchant, les séquences endocytiques ultérieures sont fortement similaires et seront décrites dans la suite du document en se basant sur le modèle d'endocytose par récepteur interposé.

Au cours de ce type d'endocytose, l'interaction entre le ligand et son récepteur provoque un changement de conformation de la structure tertiaire de ce dernier, ce qui en retour a pour conséquence l'exposition d'un domaine ou d'une séquence signal contenue dans une de ses régions cytoplasmiques. L'exposition de cette séquence signal est alors responsable du transfert du complexe ligand-récepteur au niveau des puits tapissés de clathrine.

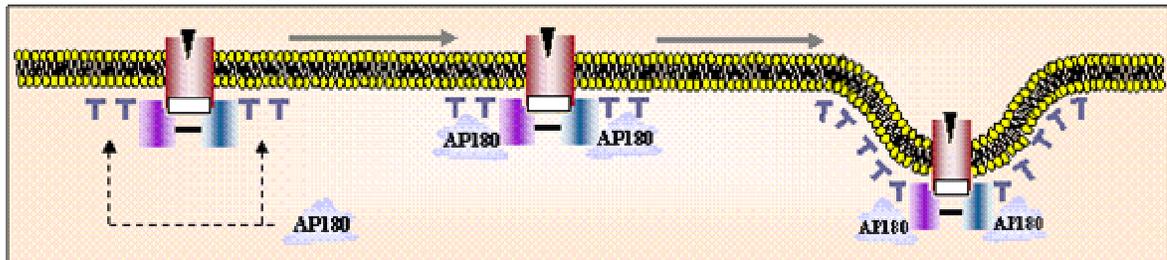
### ***II.2.2/- Propagation du processus***

L'étape suivante dans le processus endocytique correspond à la formation de la cage de clathrine (**2<sup>ème</sup> étape de la figure 17**). L'élaboration de la charpente est principalement régulée par une protéine adaptatrice spécifique, AP-180 dans le cerveau (Murphy *et al*, 1991; Zhou *et al*, 1993) et son homologue CALM (pour

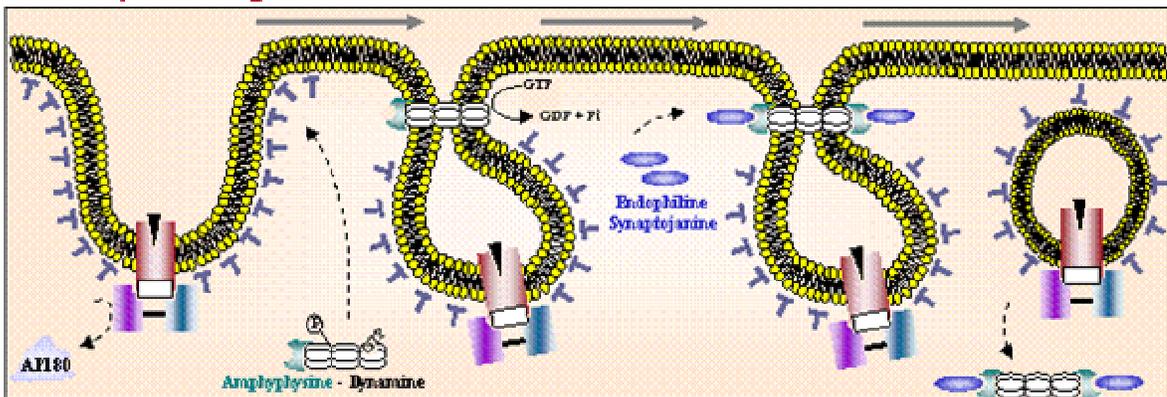
### 1<sup>ère</sup> étape : initiation



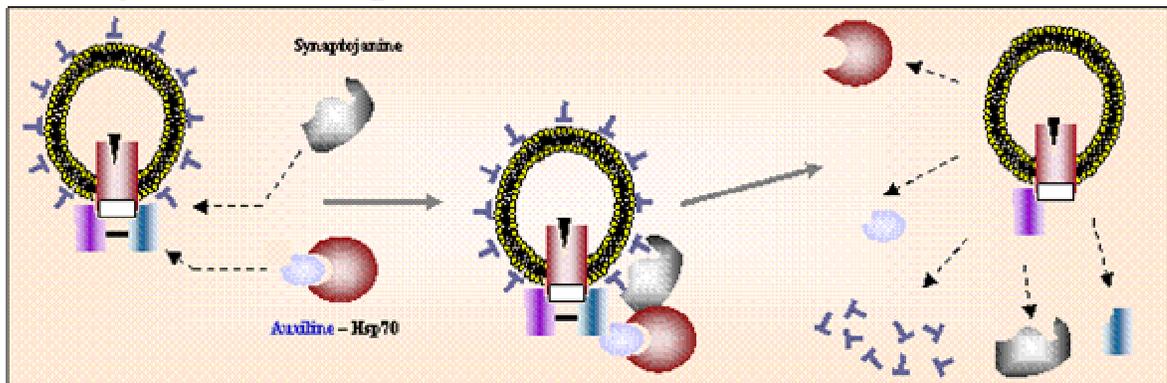
### 2<sup>ème</sup> étape : propagation



### 3<sup>ème</sup> étape : bourgeonnement



### 4<sup>ème</sup> étape : désassemblage



**Figure 17 : L'endocytose clathrine-dépendante.**

L'endocytose clathrine-dépendante peut être décrite en 4 étapes : (a) l'initiation du processus qui fait intervenir la clathrine, la protéine adaptatrice AP-2 et la  $\beta$ -arrestine ou ubiquitine; (b) la propagation de l'élaboration de la cage de clathrine, où intervient la protéine adaptatrice AP-180; (c) le bourgeonnement vésiculaire qui est déclenché par l'action de nombreuses enzymes, dont la dynamine, la synaptojanine et l'endophiline. A ce niveau, l'emphiphysine sert de plate-forme d'interaction protéine-protéine, (d) et enfin le désassemblage du tapis de clathrine qui dépend de l'action d'un isoforme de la synaptojanine, de Hsp70 et de l'auxilime.

«clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia) dans les autres tissus (Dreyling *et al*, 1996 ; Tebar *et al*, 1999). De manière succincte, l'interaction simultanée d'AP-180 (ou de CALM) avec la clathrine et les protéines adaptatrices AP-2 engendre la formation de complexes AP-180 / AP-2 / clathrine, qui en retour génèrent l'assemblage des triskelions autour de la vésicule en formation (Morris *et al*, 1993 ; Ye et Lafer, 1995 ; Hao *et al*, 1999).

### **II.2.3/- Bourgeonnement des vésicules**

Bien que le mécanisme par lequel les invaginations de la membrane plasmique sont ensuite converties en vésicules d'endocytose ne soit pas encore totalement déterminé, la dynamine, une guanosine triphosphatase cytoplasmique (GTPase) semble néanmoins être le facteur central de régulation de ce processus (Kosaka et Ikeda, 1983 ; Shpetner et Vallee, 1989 ; Chen *et al*, 1991 ; van der Blik et Meyerowitz, 1991). En effet, l'expression chez *Drosophila* d'un mutant de dynamine incapable de catalyser l'hydrolyse du GTP en GDP + Pi, supprime totalement le bourgeonnement des vésicules d'endocytose et s'accompagne d'une inhibition du processus endocytique clathrine-dépendant. (Schmid *et al*, 1998). De plus, bien que la dynamine semble jouer un rôle crucial au cours de cette étape de bourgeonnement vésiculaire, celle-ci contient également dans sa structure des domaines capables d'interagir avec d'autres protéines adaptatrices et facteurs de régulation. La dynamine interagit ainsi, d'une part, par l'intermédiaire de ses domaines « Src Homology-3 » SH3 avec l'endophiline (Ringstad *et al*, 1999) et avec l'amphyphysine (David *et al*, 1996), et d'autre part, avec certains phospholipides membranaires *via* son domaine « pleckstrin homology » (PH) dont les principaux sont les phosphatidylinositol-(3, 4, 5)-triphosphate (PIP<sub>3</sub>) et phosphatidylinositol (4, 5) biphosphate (PIP<sub>2</sub>) (Salim *et al*, 1996 ; Artalejo *et al*, 1997 ; Lee *et al*, 1999).

Ainsi, comme le montre la **3<sup>ème</sup> étape de la figure 17**, lors du processus final d'assemblage des unités de clathrine au niveau des invaginations membranaires, les protéines adaptatrices AP-2 interagissent avec l'amphyphysine (Wigge *et al*, 1997), une protéine cytoplasmique, qui permet alors le recrutement de la dynamine sous sa forme phosphorylée et liée au GTP (Owen *et al*, 1998). Cette dernière engendre une constriction des invaginations membranaires, à la suite de l'hydrolyse du GTP en GDP + Pi, observable en microscopie électronique sous la forme de longues

structures tubulaires dont l'interface avec la membrane plasmique est très étroite (Takei *et al*, 1998 ; Sweitzer et Hinshaw, 1998). La translocation à la membrane du complexe amphiphysine-dynamine provoque un nouveau changement de conformation de la dynamine, ce qui permet en retour son interaction avec la clathrine, la synaptojanine et l'endophiline (Dehevel *et al*, 1997 ; Simpson *et al*, 1999 ; Cestra *et al*, 1999).

L'endophiline, une lysophosphatidique acide acyltransférase, catalyse alors la réaction de conversion de l'acide lysophosphatidique en acide phosphatidique, ce qui a pour conséquence de favoriser la déformation de la bicouche lipidique nécessaire au bourgeonnement. L'amphiphysine interagit ensuite avec la synaptojanine, une phosphatidylinositol phosphatase (Haffner *et al*, 1997 ; Woscholski *et al*, 1997), responsable de la déphosphorylation des inositolphosphate (PIPs), eux-mêmes préalablement recrutés à ce niveau par la dynamine. Le recrutement de PIPs et la déphosphorylation de ces derniers par la synaptojanine semblent être un des processus à l'origine de la fermeture des invaginations au niveau de la constriction membranaire. Enfin, la synaptojanine catalyse également la déphosphorylation de la dynamine et induit ainsi son découplage avec la charpente de clathrine.

#### **II.2.4/- Désassemblage de la matrice**

Une fois les vésicules d'endocytose détachées de la membrane plasmique, ces dernières sont alors dirigées soit vers des compartiments intracellulaires spécifiques, soit vers un complexe enzymatique pour une dégradation ultérieure des substances endocytées. Néanmoins, quel que soit le devenir intracellulaire des cargos, les vésicules d'endocytose perdent leur tapis de clathrine au cours de leur trajet par un mécanisme de désassemblage (**4<sup>ème</sup> étape de la figure 17**) qui implique hsc70, un membre de la famille des « heat shock cognate proteins ATPase », l'auxiline (Ungewickell, 1999) et très probablement la synaptojanine-1 (Cremona *et al*, 1999).

D'une part, Hsc70 est un facteur qui stimule le désassemblage d'une grande variété de complexes protéiques par un mécanisme de déplacement des équilibres d'association et de dissociation. D'autre part, les protéines associées à Hsc70 contiennent dans leur structure primaire des domaines J, dont l'auxiline fait partie

(Ungewickell *et al*, 1995). L'auxiline est ainsi capable d'interagir avec hsc70, et les travaux de Barouch et ceux de Holstein laissent supposer que le rôle de l'auxiline correspond au recrutement de hsc70 au niveau des vésicules d'endocytose (Holstein *et al*, 1996 ; Barouch *et al*, 1997). Dans un même temps, un isoforme de la synaptojanine, la synaptojanine-1, catalyse la réaction de conversion du PIP<sub>3</sub>, impliqué dans l'ancrage des protéines adaptatrices AP-2 à la membrane (Gaidarov et Keen, 1999), en PIP<sub>2</sub> et induit ainsi la dissociation entre AP-2 et la charpente des vésicules (Cremona *et al*, 1999). Il s'ensuit un désassemblage progressif de l'édifice, menant *in fine* à l'élaboration d'une vésicule d'endocytose dépourvue de clathrine.

### **II.3/- Devenir et transport des substances endocytées**

Les substances extracellulaires, les lipides et protéines membranaires entrant dans la composition des vésicules d'endocytose sont ensuite transportées au niveau d'un premier compartiment intracellulaire, les endosomes primaires (Dunn *et al*, 1989), au niveau desquels a lieu une acidification du milieu intra-endosomal. Cette acidification est dans un premier temps nécessaire à la dissociation des complexes ligand-récepteur internalisés, puis dans un deuxième temps à l'activation des hydrolases acides responsables de la dégradation lysosomiale des composés endocytés. A partir des endosomes primaires, les substances extracellulaires endocytées sont alors soit transférées vers les complexes enzymatiques 26S, dont le cœur catalytique comprend un complexe 20S appelé protéasome (Ciechanover, 1994), soit vers les endosomes secondaires, où débutent les processus de digestion enzymatique, puis vers les lysosomes au sein desquels est réalisée l'étape finale de la dégradation.

### **II.4/- Acidification du milieu intra-endosomal**

Un des paramètres essentiel, impliqué dans le processus de transfert du matériel endocyté vers les endosomes primaires (de tri ou de recyclage), les endosomes secondaires puis vers les lysosomes, et dans le recyclage des composés membranaires (récepteurs, canaux, transporteurs) à la surface des cellules, correspond à l'acidification des divers compartiments endocytiques (Mellman, 1992). En outre, les nombreuses études visant à déterminer les mécanismes cellulaires gouvernant l'acidification des compartiments endocytiques mettent en évidence une hétérogénéité considérable des valeurs de pH au sein des

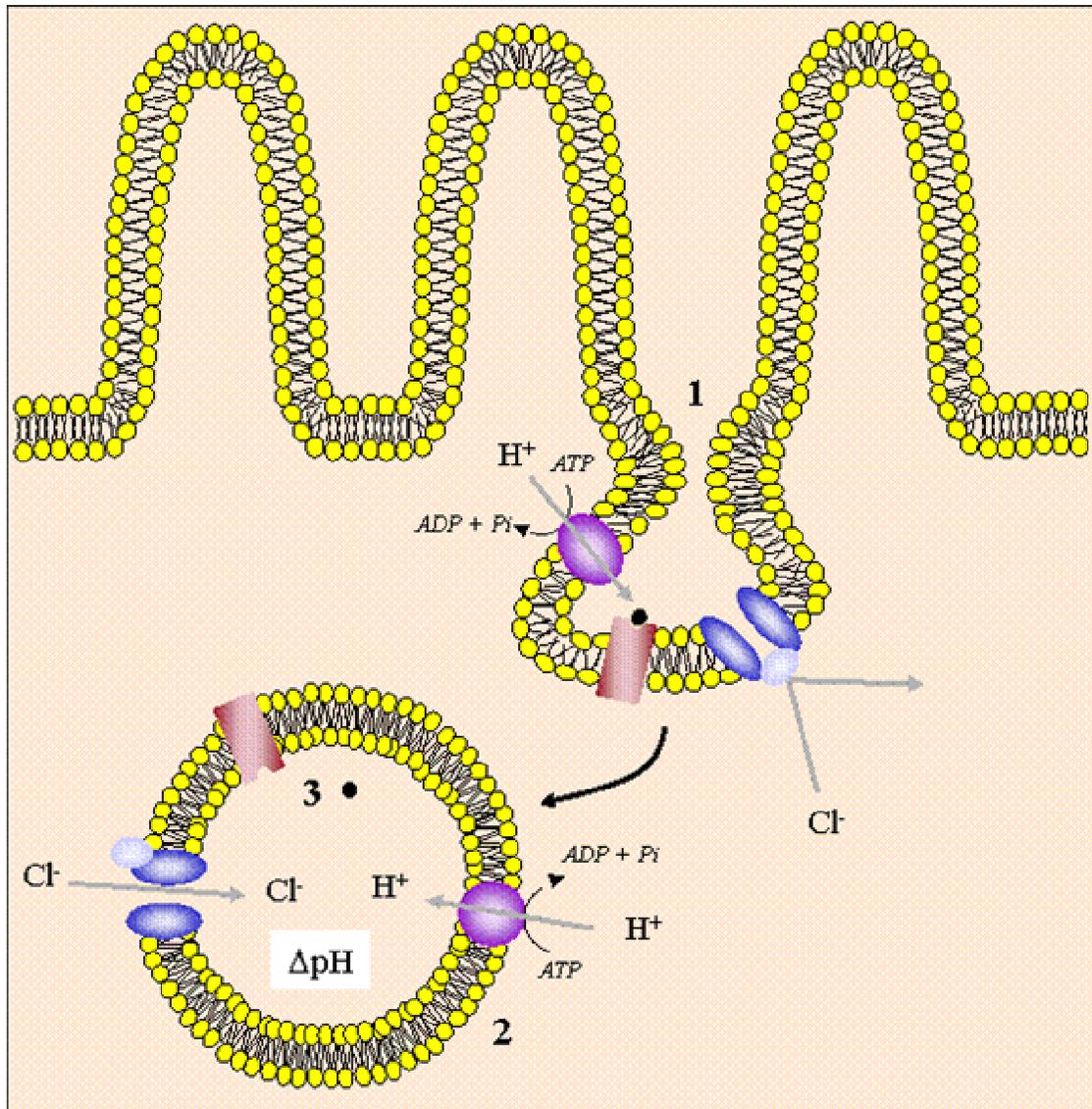
différents compartiments (Marshansky *et al*, 1996). De tels résultats laissent ainsi suggérer que le transport et la maturation des vésicules d'endocytose sont associés à une acidification progressive des organites au cours du transfert du matériel endocyté.

#### **II.4.1/- Mécanisme de régulation de l'acidification endosomale**

L'acidification des compartiments endosomaux est accomplie par l'intermédiaire de protéines particulières, les pompes H<sup>+</sup>-ATPases de type-V (Forgac, 1992 ; Gluck, 1992 ; Nelson, 1992), qui accomplissent le transport des protons du cytoplasme vers la lumière endosomale (**figure 18**). Ce transfert génère de la sorte un gradient de proton (H<sup>+</sup>) et l'apparition d'un potentiel électrique positif. Ce dernier, qui serait en temps normal responsable d'une réduction du gradient protonique, est néanmoins contrebalancé par la présence de canaux chlore (Cl<sup>-</sup>) (Schwiebert *et al*, 1994). L'amplitude du gradient de pH produit est par conséquent régulée conjointement par les canaux Cl<sup>-</sup> et les pompes H<sup>+</sup> ATPases. L'ouverture d'un seul canal Cl<sup>-</sup> pendant 10% du temps est en effet susceptible de compenser le potentiel électrique produit par 1000 pompes H<sup>+</sup>-ATPases. Ainsi, la probabilité d'ouverture des canaux Cl<sup>-</sup> régule et contrôle le gradient électrochimique protonique généré par les pompes H<sup>+</sup>-ATPases (Harvey, 1992).

#### **II.4.2/- Rôle fonctionnel du processus d'acidification.**

Il est généralement admis que l'une des fonctions principales de l'acidification des endosomes concerne la dissociation des complexes récepteur-ligand (Wileman *et al*, 1985 ; Mellman *et al*, 1986). De plus, bien que les mécanismes ne soient pas encore connus à ce jour, il semblerait que la mise en place de ce gradient électrochimique protonique joue également un rôle important dans les processus de bourgeonnement (Aniento *et al*, 1996) et de fusion des vésicules (Diaz *et al*, 1988 ; Biwersi *et al*, 1996).



**Figure 18 :** Représentation schématique du mécanisme d'acidification vésiculaire et endosomal, et de son implication dans la dissociation du complexe ligand-récepteur.

Au cours de la formation des vésicules d'endocytose, de nombreuses protéines membranaires sont recrutées au niveau des puits tapissés de clathrine, dont les canaux  $Cl^-$  et les pompes  $H^+$ -ATPases (1). Lors du transfert de la vésicule d'endocytose vers les endosomes primaires, les pompes  $H^+$ -ATPases en coordination avec les canaux  $Cl^-$  engendrent une diminution du pH intra vésiculaire (2) qui est responsable de la dissociation des complexes ligand-récepteur (3).

### **III/- L'endocytose clathrine-indépendante**

La preuve la plus probante démontrant l'existence d'un processus endocytique différent de l'endocytose clathrine-dépendante provient des observations faites à partir des études concernant le mode d'internalisation d'un marqueur d'endocytose en phase fluide : l'horseradish peroxidase (HRP) ou peroxydase du raifort. Tandis que la sur-expression dans les cellules HeLa d'un mutant de dynamine, incapable d'hydrolyser le GTP, abolit totalement l'internalisation clathrine-dépendante de la transferrine, en revanche, le taux d'absorption de la HRP demeure inchangé (Damke *et al*, 1995). Trois modes d'endocytose clathrine-indépendante sont connus à ce jour : la phagocytose, la macropinocytose et l'endocytose cavéoline-dépendante. L'endocytose en phase fluide semble quant à elle être la résultante d'une association de ces multiples mécanismes.

#### **III.1/- La phagocytose**

La phagocytose, identifiée par Metchnikoff à la fin du XIXème siècle (Metchnikoff, 1893), est un processus cellulaire récepteur-dépendant et clathrine-indépendant qui dépend fortement de l'état du réseau cytosquelettique. Il s'agit d'un processus atypique exprimé principalement au sein de cellules spécialisées telles que les neutrophiles, les monocytes, les macrophages et les cellules appartenant à la lignée myélogénique dans le cerveau : les cellules de la microglie.

Le mécanisme par lequel les particules sont internalisées s'effectue soit directement par l'intermédiaire de récepteurs membranaires, soit après une première phase de complexation du ligand avec le complément et/ou les immunoglobulines (Greenberg et Silverstein, 1993). La phagocytose suit alors un modèle de "fermeture éclair" (Griffin *et al*, 1975 et 1976) accompagné par la genèse de pseudopodes englobant la particule devant être endocytée. L'élaboration de ces extensions membranaires s'accompagne d'un recrutement séquentiel de récepteurs, qui en retour permettent leur élongation en activant une cascade d'évènements enzymatiques intracellulaires (Greenberg et Silverstein, 1993). Cette dernière engendre alors la réorganisation du cytosquelette d'actine au niveau sub-membranaire et facilite l'élongation des pseudopodes (May et Machesky, 2001). Ces voies de signalisation intracellulaires font intervenir de nombreux partenaires enzymatiques tels que les protéines kinases C (PKC), certaines phospholipases

(PLC $\gamma$ , PLD et PLA), des phosphoinositol kinases (PI 3-K, PIP5K1 $\alpha$  ...), ou encore des petites protéines G (pour revue : May et Machesky, 2001). Il s'ensuit la formation d'un organite intracellulaire, le phagosome, au niveau duquel débute la dégradation des substances internalisées qui seront par la suite transférées *via* les endosomes primaires aux lysosomes. La fusion des phagosomes avec les lysosomes donne ainsi naissance aux phagolysosomes (Pitt *et al*, 1992). La taille des particules phagocytées est généralement supérieure à 0.5  $\mu$ m.

### **III.2/- La macropinocytose**

Observée pour la première fois en 1931 à l'aide d'une technique de micro-cinématographie par Lewis, la macropinocytose est un processus constitutif chez les macrophages et chez certaines cellules tumorales (Willingham et Yamada, 1978 ; Haigler *et al*, 1979). Contrairement à l'endocytose classique, mais de manière similaire à la phagocytose, la formation de macropinosomes, dont le diamètre est parfois supérieur à 5  $\mu$ m et le contenu non-sélectif, résulte non pas de l'invagination de la membrane plasmique, mais d'une extension extracellulaire de la bicouche lipidique : les lamellipodes. Cependant, bien que la macropinocytose ressemble en quelques points à la phagocytose, les 2 processus de régulation sont toutefois différents. D'une part, la formation des lamellipodes et des macropinosomes est indépendante de l'interaction entre les récepteurs membranaires et les substances absorbées. D'autre part, le devenir intracellulaire des macropinosomes varie considérablement en fonction des types cellulaires. Dans la majorité des cas, leur formation s'accompagne d'une acidification du milieu intra-macropinosomal, puis ils rétrécissent et disparaissent du compartiment cytosolique. Dans d'autres situations, ils interagissent avec les compartiments endosomaux, puis fusionnent *in fine* avec les lysosomes (Racoosin et Swanson, 1993 ; Berthiaume *et al*, 1995). Enfin, dans certains types cellulaires particuliers, les macropinosomes néoformés restent isolés dans le cytoplasme, puis rejettent leur contenu dans le milieu extracellulaire (Hewlett *et al*, 1994).

### **III.3/- L'endocytose cavéoline-dépendante**

#### **III.3.1/- Généralité**

Les caveolae sont des structures membranaires particulières, riches en sphingolipides et en cholestérol, exprimées au sein d'une grande variété de tissus et

intimement impliqués dans de nombreux processus cellulaires (Smart *et al*, 1999). En effet, bien qu'il ait été initialement supposé que les caveolae étaient spécifiquement impliqués dans la transcytose, un mécanisme de transport *trans*-cellulaire, il est cependant rapidement apparu que ceux-ci étaient également impliqués dans d'autres processus physiologiques. Ainsi, les travaux d'Anderson (Anderson, 1993) et ceux de Sargiacomo (Sargiacomo *et al*, 1993) ont permis de mettre en évidence la présence de nombreux facteurs de transduction des signaux extracellulaires au sein de ces structures, ce qui suggère un rôle important des caveolae dans certains processus de régulation de l'homéostasie cellulaire. D'autre part, puisque l'oxydation du cholestérol engendre une redistribution intracellulaire de la cavéoline, un marqueur des caveolae (Lisanti *et al*, 1994), et que la transfection de cellules en culture avec l'ADNc codant pour la cavéoline-1 provoque une augmentation de la teneur en cholestérol membranaire, il est également suggéré que la cavéoline et les caveolae participent au transport et à la régulation de l'homéostasie du cholestérol cellulaire (Conrad *et al*, 1995 ; Uittenbogaard *et al*, 1998 ; Uittenbogaard et Smart, 2000). Plus récemment, il a été démontré que les caveolae sont aussi des formations cellulaires capables de se détacher de la membrane plasmique et de générer des vésicules d'endocytose tapissées de cavéoline, dont la taille est de 50 à 100 nm de diamètre (Schnitzer *et al*, 1994 et 1995 ; Schnitzer et Liu, 1995). Les caveolae représentent ainsi une nouvelle voie d'endocytose et d'internalisation de substances extracellulaires.

### **III.3.2/- Définition des caveolae**

Les caveolae sont classiquement définis comme étant de petites invaginations de la membrane plasmique (ou microdomaines), riches en cholestérol et en sphingomyéline, appauvries en phospholipides, et non tapissées par la clathrine (**tableau III**). Néanmoins, lorsque la teneur cellulaire en cholestérol est fortement réduite, voire supprimée, les caveolae sont également présents à la surface des cellules sous une forme aplatie (Rothberg *et al*, 1990 ; Chang *et al*, 1992). Ces observations suggèrent que le cholestérol est un des facteurs essentiels dans la genèse et le maintien des invaginations membranaires. Un second facteur jouant un rôle crucial dans la formation et le transport *via* les caveolae est, semble-t-il, une protéine de 22 kDa : la cavéoline, (Rothberg *et al*, 1992). D'une part, la transfection de certaines cellules avec l'ADNc codant pour la cavéoline engendre la formation

d'invaginations membranaires au niveau desquelles la cavéoline peut être localisée (Fra *et al*, 1995 ; Smart *et al*, 1996) ; d'autre part, l'oxydation du cholestérol par la cholestérol oxydase provoque la translocation et la redistribution cellulaire de la caveoline (Smart *et al*, 1994). Cette dernière est ainsi transportée de la membrane plasmique vers le réticulum endoplasmique (RE) et cela en absence d'altérations détectables au niveau de la structure des caveolae.

Outre la cavéoline, les protéines associées aux caveolae sont nombreuses et regroupent à la fois des protéines acétylées, des protéines ancrées à la membrane plasmique par l'intermédiaire d'un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI), des protéines isoprénylées, des récepteurs, des enzymes impliquées dans la transduction du signal, des transporteurs ou encore des protéines structurales (**tableau III**). Certaines d'entre elles sont préférentiellement localisées aux niveau des caveolae, d'autres sont simplement enrichies dans les microdomaines lipidiques ,mais sont également localisées au niveau d'autres structures cellulaires, et enfin, certaines d'entre elles ne sont que transitoirement colocalisées avec les caveolae.

### ***III.3.3/- L'endocytose par les caveolae***

Bien que les caveolae soient des microdomaines lipidiques membranaires stables, dont la fonction endocytique est non constitutive (Thomsen *et al*, 2002), plusieurs études démontrent néanmoins que ces structures sont capables d'internaliser des molécules extracellulaires. Le récepteur de l'acide folique, les toxines du tétanos et du choléra, le virus SV40 et certaines souches d'*Escherichia coli* semblent en effet être sélectivement internalisés *via* ces structures membranaires (Montesano *et al*, 1982 ; Anderson *et al*, 1992 ; Anderson *et al*, 1996 ; Shin *et al*, 2000).

<i>Lipides</i>	<i>Association avec les caveolae</i>
Cholestérol	Enrichi
Triacylglycérol	Déprimé
Diacylglycérol	Transitoirement enrichi
Phosphatidylcholine	Déprimé
Phosphatidylinositols	Transitoirement enrichi
Céramide	Transitoirement enrichi
Sphingomyeline	Enrichi
Glycosphingolipides	Enrichi

<i>Protéines enrichies dans les caveolae</i>	<i>Exemples de protéines</i>
Protéines acétylées	Les protéines Ga et Gb, Src, Fyn, Hck
Les protéines ancrées dans la membrane par un groupement glycosylphosphatidylinositol	Le récepteur à l'acide folique, Thy 1 Le prion, CD14, le récepteur à l'urokinase La phosphatase alcaline
Les protéines prénylées	Rap 1A, Ras
Certains récepteurs membranaires	Le récepteur à l'insuline, $\beta$ -adrénergique
Des enzymes	PKC $\alpha$ , GRB <sub>2</sub> , SOS, SHC, PI 3-kinase
Des transporteurs	La porine, l'aquaporine-1, la Ca <sup>2+</sup> ATPase
Des protéines de structure	L'ezerine, l'annexine, la myosine, MAL

**Tableau III : Liste de la composition lipidique et protéique des caveolae.**

A ce jour, l'état des connaissances concernant les mécanismes cellulaires impliqués dans ce type d'endocytose et le devenir intra-cytoplasmique des substances internalisées reste encore rudimentaire. Néanmoins, les travaux préliminaires menées dans le but de caractériser la machinerie enzymatique cellulaire impliquée dans la formation et la maturation des vésicules tapissées par la cavéoline indiquent qu'une des étapes essentielles lors du bourgeonnement vésiculaire fait intervenir l'hydrolyse du GTP en GDP + Pi. Ce processus n'est pas sans rappeler l'étape initiale impliquée dans la formation des vésicules tapissées de clathrine, et de manière intéressante, il a récemment été démontré que la réaction d'hydrolyse du GTP est catalysée par un isoforme de la dynamine (Henley *et al*, 1998 ; Oh *et al*, 1998).

En revanche, contrairement aux vésicules d'endocytose tapissées de clathrine, une fois détachées de la membrane plasmique, les vésicules ne sont pas orientées vers les compartiments endosomaux classiques. Elles fusionnent ensemble, et forment de la sorte des structures cytoplasmiques tubulaires (Scherer *et al*, 1994 ; Kandror *et al*, 1995 ; Parton *et al*, 1997 ; Uehara et Miyoshi, 1999 ; Vasile *et al*, 1999 ; Robinson *et al*, 1999). L'étude du processus d'internalisation du virus SV40 a ainsi permis l'identification d'un nouveau compartiment intracellulaire, non endosomal et non lysosomal, caractérisé par la présence de caveoline-1 : les caveosomes (Pelkmans *et al*, 2001).

#### **IV/- L'endocytose en phase fluide**

Contrairement à l'endocytose par récepteur interposé *via* les puits tapissés de clathrine, qui est aujourd'hui le processus le mieux connu et le mieux caractérisé, l'état des connaissances concernant les mécanismes de régulation de l'endocytose en phase fluide (FPE) est relativement faible. Il a néanmoins été démontré que la FPE est une fonction cellulaire constitutive, qui implique à la fois la formation de vésicules *via* l'invagination de la membrane plasmique (Watts and Marsh, 1992), et le transport de leur contenu vers une série de compartiments intracellulaires. Néanmoins, dans l'attente de la caractérisation expérimentale biochimique et morphologique de ce processus endocytique particulier, distinct des autres mécanismes précités, il est généralement admis que la FPE est la résultante d'une

assimilation des fluides extracellulaires qui s'effectue au cours des autres processus endocytique (Marsh et Helenius, 1980 ; Griffiths *et al*, 1989 ; Watts and Marsh, 1992).

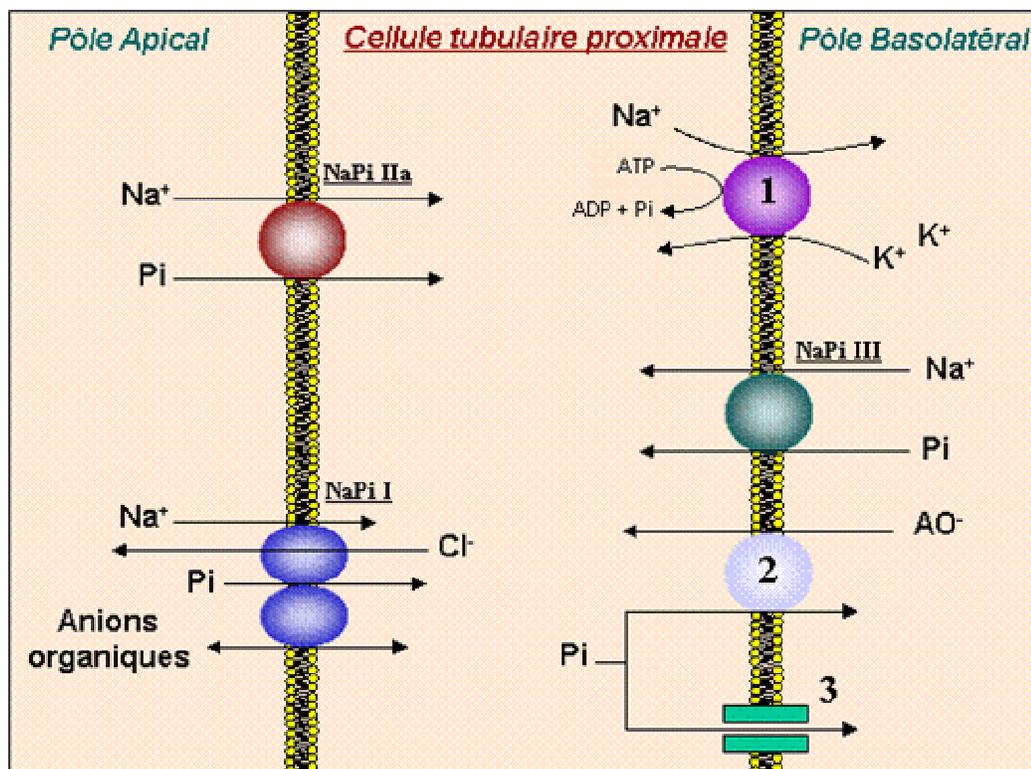
## LES CO-TRANSPORTEURS NaPi

### I/- Introduction

Le phosphate inorganique (Pi) participe au métabolisme énergétique, à de nombreux processus cellulaires (glycolyse, glucogenèse, minéralisation osseuse ...) et rentre directement dans la composition de l'ADN, de l'ARN, des protéines et des phospholipides. Le phosphate est donc un élément essentiel pour l'organisme. Chez les vertébrés, sa concentration dans les fluides intra- et extracellulaires est d'environ 1 mmol/l, et est maintenue constante par de nombreux processus localisés au niveau de plusieurs organes, ces derniers jouant ainsi un rôle crucial dans la contrôle de l'homéostasie de cet élément. C'est ainsi que les besoins journaliers en Pi sont couverts par l'apport alimentaire. Les os représentent les compartiments principaux de stockage du Pi, et sa concentration dans les fluides biologiques est contrôlée par une régulation hormonale et non-hormonale très fine au niveau rénal (Bonjour et Caverzasio, 1984). Il s'avère que le taux d'excrétion urinaire en Pi correspond directement au taux d'absorption intestinal, qui est de l'ordre de 10 à 20% du taux sanguin, et par conséquent 80 à 90% de la charge rénale filtrée est réabsorbée. Dans le rein, bien qu'une petite fraction du phosphate soit réabsorbée par l'épithélium tubulaire distal (Amiel *et al*, 1970), cette réabsorption s'effectue néanmoins majoritairement par les cellules de l'épithélium tubulaire proximal (Poujeol *et al*, 1977 ; Haas *et al*, 1978 ; Barrett et Arronson, 1982 ; Barac-Nieto *et al*, 1990) *via* un transport actif secondaire sodium-dépendant réalisé par des cotransporteurs appartenant à la famille des protéines NaPi (**figure 19**). Trois sous-familles de protéines NaPi sont connues à ce jour : les cotransporteurs NaPi de type I, de type II et de type III (**tableau IV**).

### II/- La famille des protéines NaPi : structure et localisation (tableau IV)

L'ADN complémentaire (ADNc) codant pour une protéine membranaire capable de transporter le Pi dont l'activité est dépendante d'un gradient électrochimique en Na<sup>+</sup> a été isolé et cloné pour la première fois en 1991 (Werner *et*



**Figure 19 : La famille des protéines de type NaPi.**

Il existe 3 sous-familles de cotransporteurs de type NaPi, NaPi I, NaPi II et NaPi III. Ces 3 sous-familles sont exprimées dans le rein et sont notamment localisées dans les trois segments tubulaires proximaux. Les cotransporteurs NaPi I NaPi II sont exprimés au pôle apical des cellules du tubule proximal. En revanche, le cotransporteur NaPi III est localisé au pôle apical. L'un des 3 membres de la sous-famille NaPi II, NaPi IIa, est responsable de la réabsorption massive du Pi contenu dans l'urine primitive. Le cotransporteur NaPi I permet le transport d'anions organiques et semble donc impliqué dans la sécrétion de ces molécules. NaPi III est impliqué dans le contrôle de l'homéostasie du Pi cellulaire. La réabsorption cellulaire du Pi au pôle apical est couplée à la sortie au pôle basolatéral du Na<sup>+</sup>, qui s'effectue par l'intermédiaire de la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase (1), et du Pi, qui est réalisée par un système de transport facilité (2). Il semblerait qu'il existe également sur la face basolatérale des canaux Pi.

<i>Nom de la famille</i>	<i>Type I</i>	<i>Type II</i>		<i>Type III</i>
		<i>Type IIa</i>	<i>Type IIb</i>	
Nom des isoformes	NaPi-I de lapin, rat, souris ou humaine (NaPi-1, <i>NPT1</i> , Npt1)	NaPi-IIa de souris, rat, homme, lapin ou d'opossum (NaPi-2/3/4/6/7)	NaPi-IIa de souris, humaine ou de <i>Xenope</i> (NaPi-5)	Glv-1 (PiT-1) Ram-1 (PiT-2) de souris, rat ou humaine
Localisation Chromosomique	6	5	4	2 (PiT-1) 8 (PiT-2)
Séquence primaire	≈ 465	≈ 640	≈ 690	≈ 679, 656
Nombre de segments transmembranaires	6-8	8	8	10
Fonctions	co-transport Na <sup>+</sup> et Pi Transport d'anions organiques	co-transport Na <sup>+</sup> -Pi électrogénique et pH dépendance	co-transport Na <sup>+</sup> -Pi électrogénique	co-transport Na <sup>+</sup> -Pi électrogénique
Substrats	Pi et anions organiques	Pi	Pi	Pi
Affinité pour le Pi	0.3 à 1 mM	0.1 à 0.2 mM	0.05 mM	0.025 mM
Affinité pour le Na <sup>+</sup>	50 à 60 mM	50 à 70 mM	33 mM	40 à 50 mM
Stoichiométrie Na <sup>+</sup> /Pi	>1	3	3	3
Dépendance au pH	---	stimulé à pH élevé	inhibé à pH élevé	inhibé à pH élevé
Expression tissulaire	cortex rénal/TP, foie et cerveau	cortex rénal/TP	intestin, poumon, et autres tissus	ubiquitaire
Régulation par la PTH	non	oui	non	non
Régulation par le Pi	non	oui	oui	oui

**Tableau IV** : Caractéristiques structurales et fonctionnelles des 3 membres de la famille des co-transporteurs NaPi.

*al*, 1991). Il est cependant très rapidement apparu que les caractéristiques électrophysiologiques de cette protéine, alors dénommée NaPi-1 (un des isoformes de la sous-famille NaPi I), ne répondaient pas aux critères physiologiques et fonctionnels du mécanisme tubulaire proximal impliqué dans la réabsorption du Pi (Biber *et al*, 1993a et 1993b). La reprise des recherches a alors conduit, 2 années plus tard, à la découverte des 2 premiers membres d'une nouvelle sous-famille de protéines : les cotransporteurs NaPi de type IIa et IIb (Magagnin *et al*, 1993), puis en 1994, d'une troisième sous-famille, les cotransporteurs NaPi de type III, regroupant les protéines Glvr-1 et Ram-1 (Kavanaugh *et al*, 1994). Bien que ces 3 sous-familles de protéines soient localisées dans le rein, les profils d'expression sont néanmoins sensiblement différents. C'est ainsi que les teneurs relatives en ARNm sont respectivement de 15% pour le cotransporteur NaPi I, de 84% pour NaPi II et proche de 1% pour NaPi III (Tenenhouse *et al*, 1998c)

### **II.1/- La sous-famille NaPi I**

L'ADNc codant pour le cotransporteur NaPi I, isolé pour la première fois à partir du cortex rénal de lapin, code pour une protéine composée de 465 acides aminés environ (Werner *et al*, 1991), dont le poids moléculaire est respectivement de 55 et de 65 kDa sous ses formes non-glycosylée et glycosylée. Depuis la découverte du premier isoforme, de nouveaux membres de cette sous-famille de protéines ont été clonés à partir de cortex rénal humain (Chong *et al*, 1993 ; Miyamoto *et al*, 1995 ; Ni *et al*, 1996), de rat (Ni *et al*, 1994) et de souris (Chong *et al*, 1995). Quelle que soit l'espèce considérée, la localisation tissulaire par immunohistochimie du cotransporteur NaPi I a été mise en évidence au niveau du rein, du foie et du cerveau. D'un point de vue structural, bien que la structure tertiaire précise des protéines NaPi de type I n'ait jamais été déterminée expérimentalement, l'analyse prédictive basée sur le degré d'hydrophobicité de la séquence en acides aminées de la protéine indique la présence théorique de 6 à 8 segments transmembranaires reliés entre eux par des boucles intra- et extracellulaires dont l'une d'entre elles contient 3 sites de *N*-glycosylation (Werner *et al*, 1991).

La détermination des caractéristiques fonctionnelles de cette sous-famille de protéines après transfection *in vitro* (Quabius *et al*, 1995), ou clonage puis expression dans les oocytes de *Xenope* (Ni *et al*, 1988 ; Werner *et al*, 1991 ;

Miyamoto *et al*, 1995 ; Busch *et al*, 1996 ; Broer *et al*, 1998), montre que la constante d'affinité apparente pour le phosphate est comprise entre 0.3 mM (*NPT1*) et 1 mM (*NaPi-1*), celle-ci étant comprise entre 50 à 60 mM pour le sodium.

Au niveau rénal, et par des techniques d'hybridation *in situ* et de RT-PCR<sup>1</sup>, l'ARNm *NaPi I* est principalement détecté dans les tubules proximaux, et en plus faible quantité dans les tubules distaux (Custer *et al*, 1993 ; Chong *et al*, 1995). Sa distribution est cependant hétérogène et révèle une forte expression de la protéine dans les néphrons juxtamédullaires, c'est-à-dire au niveau de la *pars recta* (segment S3 : DeLisle *et al*, 1994). Au niveau cellulaire, le cotransporteur *NaPi I* est exprimé sur la face apicale des cellules de l'épithélium tubulaire proximal (Biber *et al*, 1993).

## **II.2/- La sous-famille NaPi II**

La sous-famille des protéines *NaPi* de type II comporte à ce jour 3 sous-types connus, *NaPi IIa*, *NaPi IIb* et *NaPi IIc*, dont l'expression spatio-temporelle et/ou la fonction physiologique sont différentes.

### **II.2.1/- le cotransporteur NaPi IIa**

L'ADNc codant pour le cotransporteur *NaPi IIa* a été identifié à partir du cortex rénal humain (Morgagnin *et al*, 1986). Les propriétés électrophysiologiques associées à cette sous-famille de cotransporteurs ont ensuite été déterminées par clonage puis expression dans les oocytes de *Xenope* et par transfection de l'ADNc codant pour ce type de cotransporteurs. *NaPi IIa* est composée approximativement de 640 Acides aminés et son poids moléculaire est évalué à 90 et 68 kDa sous ses formes glycosylée et nonglycosylée (Collins et Gishan, 1994).

Bien que chez les mammifères vertébrés le cotransporteur *NaPi* de type IIa soit préférentiellement exprimé dans le cortex rénal au niveau des tubules contournés proximaux (Collins et Gishan, 1994 ; Custer *et al*, 1994 ; Tenenhouse et, 1998; Ritthaler *et al*, 1999 ; Ritthaler *et al*, 1999), il est également localisé au niveau des ostéoclastes jouant un rôle dans la résorption osseuse (Gupta *et al*, 1997 et 2001), et dans le cerveau au niveau duquel sa fonction demeure inconnue (Hisano *et al*, 1997 ; Mulronay *et al*, 2000). De manière intéressante, l'ARNm *NaPi IIa* est également détecté par RT-PCR au niveau du tube collecteur rénal, bien que la

<sup>1</sup>RT-PCR : polymérisation en chaîne d'un ADN complémentaire obtenu après rétro-transcription de l'ARN messager correspondant.

protéine ne soit pas exprimée dans les cellules épithéliales de ce segment. Les constantes d'affinité apparente pour le Pi et pour le Na<sup>+</sup> sont respectivement comprises entre 100 et 200 μM, et entre 50 et 70 mM.

Au niveau rénal, le cotransporteur NaPi IIa est localisé au pôle apical des cellules tubulaires proximales (Custer *et al*, 1994), se distribuant de la sorte autour de la lumière tubulaire. L'évaluation par RT-PCR de la teneur en ARNm NaPi IIa, ainsi que de la teneur membranaire en protéine, déterminée par immunohistochimie, révèlent une diminution progressive du niveau d'expression du cotransporteur du segment S1 vers le segment S3 (Custer *et al*, 1994 ; Ritthaler *et al*, 1999).

### **II.2.2/- Le cotransporteur NaPi IIb**

Le cotransporteur NaPi IIb contient environ 690 AαA et partage une forte homologie de séquence au niveau des segments transmembranaires (TMs) avec les protéines NaPi IIa. En revanche, lorsque l'on considère les domaines les plus hydrophyles, c'est-à-dire les régions N- et C-terminales, ainsi que les boucles intra- et extracellulaires reliant 2 TMs, celle-ci peut être mise en évidence la présence d'une très grande variabilité dans la séquence (Hilfiker *et al*, 1998).

NaPi IIb est principalement localisé à la surface des membranes apicales des entérocytes intestinaux et des cellules épithéliales pulmonaires (les pneumocytes). L'ARNm est également détecté dans les reins de mammifères, la prostate, le pancréas et les glandes salivaires (Hayes *et al*, 1998 ; Hilfiker *et al*, 1998 ; Traebert *et al*, 1999 ; Field *et al*, 1999). Ses constantes d'affinité apparente pour le Pi et pour le Na<sup>+</sup> sont respectivement de 50 μM et 33 mM.

### **II.2.3/- Le cotransporteur NaPi IIc**

Très récemment, au cours de ses travaux portant sur la réabsorption tubulaire proximale du Pi chez de jeunes rats non-sevrés, Segawa a révélé l'existence d'un nouveau membre appartenant à la sous-famille NaPi II : le cotransporteur NaPi IIc (Segawa *et al*, 2002). Après isolation, clonage puis expression de l'ADNc codant pour cette protéine dans les oocytes de *Xenopus*, les études électrophysiologiques relatent un transport électroneutre, c'est-à-dire qu'il ne s'accompagne pas de transfert de charge, et une constante d'affinité apparente pour le Pi

approximativement de 70  $\mu$ M. Ce transporteur n'étant localisé qu'au niveau de la face apicale de l'épithélium tubulaire proximal, et n'étant plus exprimé chez les mammifères adultes, les auteurs suggèrent que le cotransporteur NaPi IIc est une protéine spécifiquement impliquée dans la croissance et le développement de l'organisme.

#### **II.2.4/- Structure tertiaire des cotransporteurs NaPi II**

Du fait de leur forte homologie de séquence et d'un profil d'hydrophobicité similaire, il est généralement admis que tous les membres appartenant à la sous-famille NaPi II présentent une structure tertiaire virtuellement identique. A partir des données structurales obtenues à la suite de l'étude du cotransporteur NaPi IIa, et bien que le nombre de TMs ne soit pas encore déterminé avec précision, la plupart des modèles publiés à ce jour proposent que les membres de la famille NaPi II sont constitués de 8 TMs (Paquin *et al*, 1999 ; Murer *et al*, 1999). Les extrémités N- et C-terminales n'étant accessibles aux anticorps qu'après perméabilisation membranaire, il est suggéré que ces dernières soient intra-cytoplasmiques (Kohl *et al*, 1998 ; Lambert *et al*, 1999). En revanche, la 4<sup>ème</sup> séquence peptidique hydrophile étant directement accessible aux anticorps, celle-ci est donc localisée sur la surface externe de la membrane plasmique et correspond à la 2<sup>ème</sup> boucle extracellulaire (EL-2) (Lambert *et al*, 1999). EL-2, qui relie ainsi les TMs 3 et 4, est plus longue que les autres boucles et possède plusieurs sites de glycosylation (Hayes *et al*, 1994).

#### **II.3/- La sous-famille NaPi III**

Isolées, puis identifiées pour la première fois en tant que récepteurs aux rétrovirus "*gibbon ape leukemia*" et "*rat amphotropic*", les protéines membranaires Glvr-1 (O'Hara *et al*, 1990) et Ram-1 (van Zeijl *et al*, 1994 ; Miller *et al*, 1994) sont maintenant dénommées Pit-1 et Pit-2 (Kavanaugh et Kabat, 1996) du fait de leur grande homologie de séquence avec une perméase au Pi identifiée chez *Neurospora crassa* (Olah *et al*, 1994), et du fait qu'elle transporte le Pi par un processus sodium-dépendant (Kavanaugh *et al*, 1994 ; Olah *et al*, 1994 ; Kavanaugh et Kabat, 1996). Pit-1 et Pit-2 partagent 59% d'homologie de séquence et leur expression tissulaire est ubiquitaire (Kavanaugh et Kabat, 1996 ; Tatsumi *et al*, 1998). Parmi les nombreux organes au niveau desquels les ARNm NaPi III ont été détectés par RT-PCR, citons les reins, la glande parathyroïdienne (Miyamoto *et al*,

2000), les os au niveau des chondrocytes (Mansfield *et al*, 2001) et des ostéoblastes (Veldman *et al*, 1995 ; Palmer *et al*, 1997), le foie, les poumons, les muscles striés squelettiques, le cœur et le cerveau (Kavanaugh et Kabat, 1996 ; Kavanaugh *et al*, 1994 ; Olah *et al*, 1994 ; Palmer *et al*, 1997 ; Silverstein, 1997 ; Cien *et al*, 1998 ; Tatsumi *et al*, 1998). La constante d'affinité apparente pour le phosphate est comprise entre 20 et 30  $\mu\text{M}$  à pH 7.5, et pour le sodium celle-ci est estimée à 50 mM (Kavanaugh *et al*, 1994 ; Olah *et al*, 1994 ; Kavanaugh et Kabat, 1996).

Givr-1 et Ram-1 sont caractérisées par une structure tertiaire similaire et sont composées de 2 grandes régions hydrophobes, chacune d'entre elle traversant 5 à 6 fois la membrane plasmique (Johann *et al*, 1992 ; Martinez et Person, 1994 ; van Zeijl *et al*, 1994). Le profil d'expression rénal de Pit-1 et de Pit-2 est identique et les 2 cotransporteurs sont localisés dans les différents segments du néphron (Silverstein, 1997 ; Tenenhouse *et al*, 1998). Lorsque l'on s'intéresse plus précisément au tubule contourné proximal, les protéines sont situées au pôle basolatéral des cellules épithéliales (Rasmussen et Tenenhouse, 1995).

### **III/- Fonction(s) rénale(s) des membres de la famille NaPi**

Quelle que soit la sous-famille de cotransporteur considéré, du fait de leur localisation tubulaire proximale, chacune d'entre elles est donc potentiellement le système membranaire à l'origine de la réabsorption rénale du Pi. Cependant, comme nous allons le voir par la suite, seul le cotransporteur NaPi IIa remplit l'ensemble des critères physiologiques du mécanisme de réabsorption tubulaire proximal du Pi. Il s'agit d'un processus actif secondaire, directement couplé au pôle apical au gradient de concentration électrochimique sodique établi entre le milieu extra- et le milieu intracellulaire ; électrogénique, c'est-à-dire qu'il s'accompagne d'un transfert de charge (+1) ; rétro-régulé par l'hormone parathyroïdienne (PTH) et par les variations de concentration extracellulaire en Pi ; et enfin, sensible aux variations du pH.

#### **III.1/- Le cotransporteur NaPi I : transporteur d'anions organiques**

Du fait de sa localisation apicale au sein de l'épithélium tubulaire proximal, il a longtemps été suggéré que le cotransporteur NaPi I était la protéine responsable de la réabsorption du Pi. Or, bien que le cotransporteur NaPi I réalise le cotransport du

Pi et du Na<sup>+</sup> (Miyamoto *et al*, 1995), ce système de transport est néanmoins insensible aux variations de pH et aux variations de la charge extracellulaire en Pi (Biber *et al*, 1993). En revanche, puisque cette sous-famille de protéines est également perméable au chlore (Cl<sup>-</sup>) et aux anions organiques tels que l'acide urique, le rouge de phénol et le probénicide (Busch *et al*, 1996 ; Yabouchi *et al*, 1998 ; Broer *et al*, 1998), le cotransporteur NaPi I est donc une protéine multifonctionnelle dont le rôle physiologique semble être associé à la sécrétion tubulaire proximale de certains anions organiques. D'autre part, puisque l'insuline provoque une stimulation du taux d'expression membranaire de la protéine dans les hépatocytes de rats (Li *et al*, 1996), et que cet effet est contre-balançé par le glucagon, il est également suggéré que le cotransporteur NaPi I participe au métabolisme cellulaire en jouant un rôle supplétif lorsque la demande cellulaire en Pi devient importante.

### **III.2/- Les co-transporteurs NaPi III : maintien de l'homéostasie cellulaire en Pi**

De manière similaire aux protéines de la sous-famille NaPi II, les cotransporteurs NaPi de type III, Glvr-1 et Ram-1, sont caractérisés par un transport de Pi Na<sup>+</sup>-dépendant et rétro-régulé par les variations de concentration extracellulaire en Pi (Kavanaugh *et al*, 1994 ; Chien *et al*, 1997 ; Martinez et Person, 1998). Cependant, du fait d'un profil d'expression tissulaire ubiquitaire, de leur localisation basolatérale au niveau de l'épithélium tubulaire proximale, et d'un mécanisme cellulaire de régulation indépendant du taux d'activation des récepteurs à la PTH (Tenenhouse *et al*, 1998 ; Boyer *et al*, 1998), ces transporteurs ne répondent pas aux critères physiologiques caractéristiques de la réabsorption rénale du Pi. Aussi, bien que leur rôle précis ne soit pas encore déterminé à ce jour, il est suggéré que ceux-ci jouent un rôle dans le contrôle et le maintien de l'état énergétique cellulaire lorsque l'apport en Pi provenant du pôle apical est insuffisant.

### **III.3/- Le cotransporteur NaPi IIa : Acteur principal de la réabsorption du Pi**

Bien que le cotransporteur NaPi IIb soit exprimé dans les cellules bordant la lumière tubulaire proximale, l'activité de ce dernier est cependant insensible aux variations de pH et le transport de Pi effectué par ce système n'est pas rétro-régulé par la PTH. NaPi IIb n'est donc pas le système de transport membranaire

responsable de la réabsorption du Pi, et la fonction de ce cotransporteur dans les reins demeure indéterminée.

En revanche, contrairement aux membres appartenant aux sous-familles NaPi I et NaPi III, et au cotransporteur NaPi IIb, le transport du Pi réalisé par NaPi IIa, localisée au pôle apical des cellules tubulaires proximales (Custer *et al*, 1994), et de loin le cotransporteur le plus exprimé dans les tubules proximaux (85% ; Tenenhouse *et al*, 1998 et 2001), répond à toutes les caractéristiques de la réabsorption rénale effective *in vivo* (Burckhardt *et al*, 1981 ; Samarzija *et al*, 1982 ; Amstutz *et al*, 1985 ; Béliveau et Strévey, 1991 ; Collins et Gishan, 1994 ; Hartmann et Wagner, 1995 ; Verri *et al*, 1995). Il s'agit en effet d'un processus électrogénique, sodium-dépendant, inhibé par l'acidification du milieu extracellulaire, régulé par la PTH et par la charge extracellulaire en Pi (Busch *et al*, 1994 ; Lötscher *et al*, 1996 et 1997 ; Forster *et al*, 1999).

L'hypothèse que le co-transporteur NaPi IIa soit le composant majeur impliqué dans la réabsorption rénale du Pi a été récemment confirmée à deux reprises. Tout d'abord en 1996 par Oberbauer, qui a montré que l'injection intraveineuse d'oligonucléotides antisens conduit à une diminution de la réabsorption rénale du Pi et à une réduction spécifique de taux d'expression membranaire de NaPi IIa (Oberbauer *et al*, 1996). Ensuite en 1998, par l'intermédiaire de la mise en place d'un modèle de souris NaPi IIa dans lequel le gène codant pour le cotransporteur NaPi IIa a été supprimé. Ainsi, tandis que chez les souris homozygotes (*Npt2*<sup>+/+</sup>) exprimant le cotransporteur NaPi IIa, 90% du Pi sont réabsorbés par les cellules de l'épithélium tubulaire proximal, chez les souris homozygote (*Npt2*<sup>-/-</sup>), l'activité de transport n'est

plus que de 20 à 30% et s'accompagne d'une hypophosphatémie et d'une élévation du taux d'excrétion urinaire en Pi (Beck *et al*, 1998). D'autre part, après inactivation du gène *Npt2*, les souris homozygotes (*Npt2*<sup>-/-</sup>) deviennent également réfractaires à l'action de la PTH (Zhao et Tenenhouse, 2000) et la réabsorption n'est plus rétro-réglée par les modifications de la concentration en Pi dans les fluides extracellulaires (Hoag *et al*, 1999).

## **IV/- Régulation physiologique de NaPi IIa**

### **IV.1/- Principaux facteurs de régulation**

#### ***IV.1.1/- La concentration plasmatique en phosphate***

A faible concentration en Pi dans les fluides biologiques, menant à l'hypophosphatémie dans les cas les plus sévères, la réabsorption tubulaire proximale du Pi est généralement de 100% (Levi *et al*, 1994 ; Boyer *et al*, 1996 ; Lotscher *et al*, 1997 ; Pfister *et al*, 1998). En revanche, lorsque la teneur sérique en Pi atteint des concentrations trop élevées, par exemple dans les cas d'une hyperphosphatémie, le taux de réabsorption rénal est significativement diminué (Knox et Haramati, 1985 ; Biber *et al*, 1985 et 1988 ; Berndt et Knox, 1992 ; Pfister *et al*, 1998). Il existe ainsi au niveau rénal un mécanisme sensible aux variations de concentration extracellulaire en Pi qui tend à rétablir l'homéostasie de cet élément lorsque sa teneur dans l'organisme varie de manière significative. Ce processus, qui contre-balance une éventuelle perte ou une surcharge phosphatémique, est un mécanisme non-hormonal (Knox et Haramati, 1985 ; Allon *et al*, 1990 ; Allon et Hruska, 1991 ; Berndt et Knox, 1992 ; Levi *et al*, 1994) et rapide, puisque ce dernier répond aux perturbations en l'espace de quelques heures.

#### ***IV.1.2/- L'hormone parathyroïdienne (PTH)***

La PTH, est une hormone endocrine continuellement sécrétée par la parathyroïde, dont le taux sérique est régulé par de nombreux facteurs. Parmi les facteurs les plus importants, citons les fluctuations des concentrations plasmatiques en Pi et en  $Ca^{2+}$ . La PTH est l'hormone phosphaturique majeure, dont la stimulation de sa sécrétion provoque une inhibition de la réabsorption tubulaire proximale du Pi qui s'accompagne d'une réduction au pôle apical des cellules de la densité membranaire en NaPi IIa (Kempson *et al*, 1995). A l'inverse, chez les rats ayant subi une parathyroïdectomie, le taux sanguin de PTH est fortement réduit et s'accompagne d'une élévation de la réabsorption tubulaire du Pi (Dousa *et al*, 1976 ; Hammerman *et al*, 1980 ; Al-Mahrouq et Kempson, 1991).

#### ***IV.1.3/- La vitamine D***

Bien que l'administration de vitamine D (1,25-Dihydroxycholecalciférol) chez le rat conduise à une stimulation de la réabsorption rénale du Pi (Kurnik et Hruska,

1984 et 1985), il est cependant difficile d'établir le mécanisme exact de son action. En effet, puisque l'augmentation de la concentration sérique en vitamine D est généralement associée à une modification des concentrations plasmatiques en calcium et en PTH (Bonjour et Caverzasio, 1984 ; Berndt et Knox, 1992 ; Dennis, 1992 ; Dousa, 1996), l'effet observé peut être la résultante d'une stimulation directe de son récepteur nucléaire, et par conséquent d'une activation de la transcription du gène codant pour le cotransporteur NaPi IIa, ou au contraire la résultante d'une action indirecte impliquant une modification des taux sanguins en calcium et en hormone phosphaturique. Or, sachant qu'*in vitro* la vitamine D induit également une stimulation du transport du Pi de manière Na<sup>+</sup>-dépendante, et que cette activation est totalement supprimée lorsque la synthèse protéique est inhibée, l'action de la vitamine D semble donc être la résultante d'un effet direct (Elgavish *et al*, 1983 ; Hoppe *et al*, 1991 ; Ahloulay *et al*, 1996).

#### **IV.2/- Les autres facteurs de régulation**

Comme nous venons rapidement de le décrire, le taux de Pi circulant, la PTH et la vitamine D sont les 3 principaux facteurs de régulation de la réabsorption tubulaire proximale du Pi. Il existe néanmoins d'autres facteurs de régulation qui sont également capables d'altérer positivement ou négativement les processus de transfert tubulaire de cet élément. L'objectif de ce travail n'étant pas de décrire les mécanismes pharmacologiques impliqués dans la régulation de la réabsorption tubulaire proximale du Pi, ces derniers ne seront pas discutés dans la suite du document, mais sont cependant résumés sous la forme d'un tableau (**tableau V**).

### **VI/- Mécanismes cellulaires impliqués dans la réabsorption du Pi.**

#### **V.1/- Modèle cinétique**

Les études réalisées par des techniques de patch clamp ont permis au cours de cette dernière décennie de caractériser les propriétés électrophysiologiques du cotransporteur NaPi IIa (Busch *et al*, 1994, 1995 et 1996 ; Wagner *et al*, 1996 ; Forster *et al*, 1997, 1998 et 1999). De manière succincte, le transport membranaire du Pi réalisé par NaPi IIa est un processus électrogénique, à l'origine d'un transfert de charge positif (+1) du milieu extra- vers le milieu intracellulaire, Na<sup>+</sup>- et partiellement voltage-dépendant.

<b>Mécanisme d'action Proposé</b>		<b>Effet sur la réabsorption TP Na<sup>+</sup>-dépendant du Pi</b>
<b>Facteurs hormonaux</b>		
Insuline	Récepteur au pôle BL Antagonise l'action de la PTH	+
GH	Récepteur au pôle BL Stimule la PLC	+
IGF-I EGF	Stimule TK Stimule TK et/ou PLC	+ + (perfusion de TP) - ( <i>in vitro</i> )
TGF- $\alpha$	Stimule TK et/ou PLC	-
TH (T <sub>3</sub> )	Stimule la transcription d'ARNm	+
LH	-CatRa ? - $\beta$ -estradiol ?	+ -
Calcitonine	Stimule [Ca <sup>2+</sup> ] intracellulaire	-
Glucocorticoïdes	?	-
ANP	Stimule GMPc Stimule [dopamine]	-
Phosphatonine (?)	?	-
Glucagon	Effet indirect (?)	-
Stanniocalcine	STC-1 Modulateurs paracrines STC-2	+ - ( <i>in vitro</i> )
Prostaglandines (PGE <sub>2</sub> )	Stimule AMPc	Effet antagoniste
Dopamine	Stimule AC	-
<b>Facteurs non-hormonaux</b>		
[calcium] plasmatique	Effet direct Module [PTH] et [Ca <sup>2+</sup> ] intracellulaire	↗ [Ca <sup>2+</sup> ] → + (perfusion) → - ( <i>in vitro</i> )
pH	Module [glucocorticoïdes]	↗ pH → +

**Tableau V : Régulation hormonale et non-hormonale de la réabsorption tubulaire du Pi.**

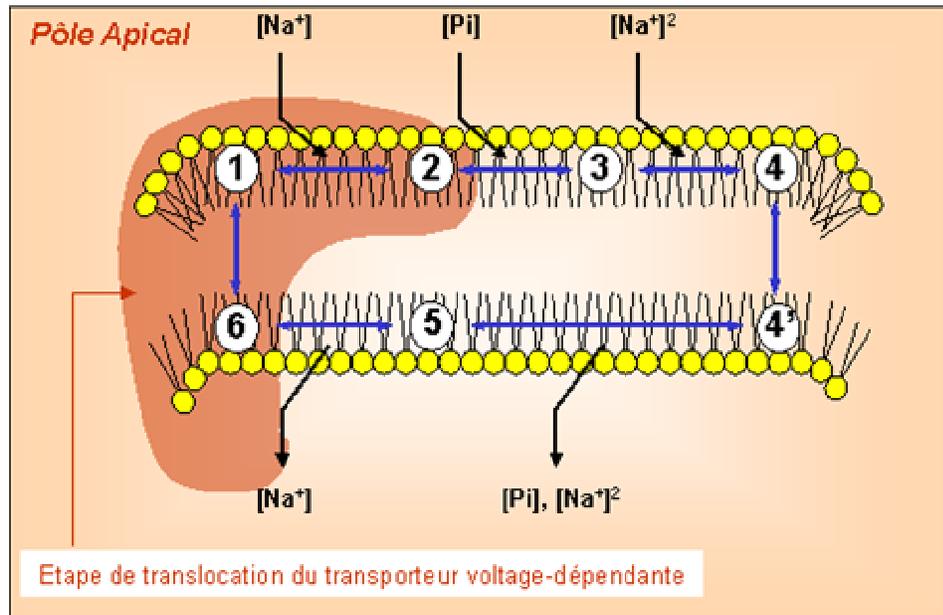
Les abréviations sont: (TP) Tubule Proximal ; (BL) Basolatéral ; (PTH) Parathyroid Hormone ; (GH) Growth Hormone ; (PLC) Phospholipase C ; (IGF-I) Insuline-like Growth Factor ; (EGF) Epidermal Growth Factor ; (TK) Tyrosine Kinase ; (TGF- $\alpha$ ) Transforming Growth Factor- $\alpha$  ; (TH) Thyroid Hormone ; (LH) Lipophilic Hormone ; (CatRA) All-trans-Retinoic Acid ; (ANP) Atrial Natriuric Peptide ; (GMPc) Guanosyl Monophosphate cyclique ; (AMPc) Adénosine Monophosphate cyclique ; (AC) Adénylate Cyclase.

De manière logique, le transport est directement dépendant des concentrations en Pi et en Na<sup>+</sup> présentes dans le fluide extracellulaire. La réduction de la concentration en Na<sup>+</sup> se manifeste par une diminution de la constante d'affinité apparente (Km) pour le Pi et d'une augmentation du nombre de transporteurs membranaires (Vmax). A l'inverse, une augmentation de la concentration en Pi est à l'origine d'une augmentation de l'affinité pour le Na<sup>+</sup>. Ainsi, la détermination des coefficients de Hill<sup>1</sup> à partir des courbes de saturation, pour chaque ion, révèle que la saturation du système est obtenue pour 1 anion phosphate et pour 3 contre-ions Na<sup>+</sup> (Forster *et al*, 1999). Par conséquent, puisque chaque cycle de transport s'accompagne d'un transfert de charge positive, et que la stochiométrie du système est de 3:1, l'ion Pi est donc préférentiellement transporté sous sa forme divalente HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> à pH proche de la neutralité (pH 7.4), bien qu'il puisse également être transporté sous sa forme monovalente H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>.

D'après l'ensemble de ces données, combinées avec d'autres résultats obtenus soit à l'état d'équilibre, soit à l'état de pré-équilibre, le transfert membranaire du Pi Na<sup>+</sup>-dépendant réalisé par les cotransporteurs NaPi IIa peut être décrit selon un modèle cinétique représenté dans la **figure 20**.

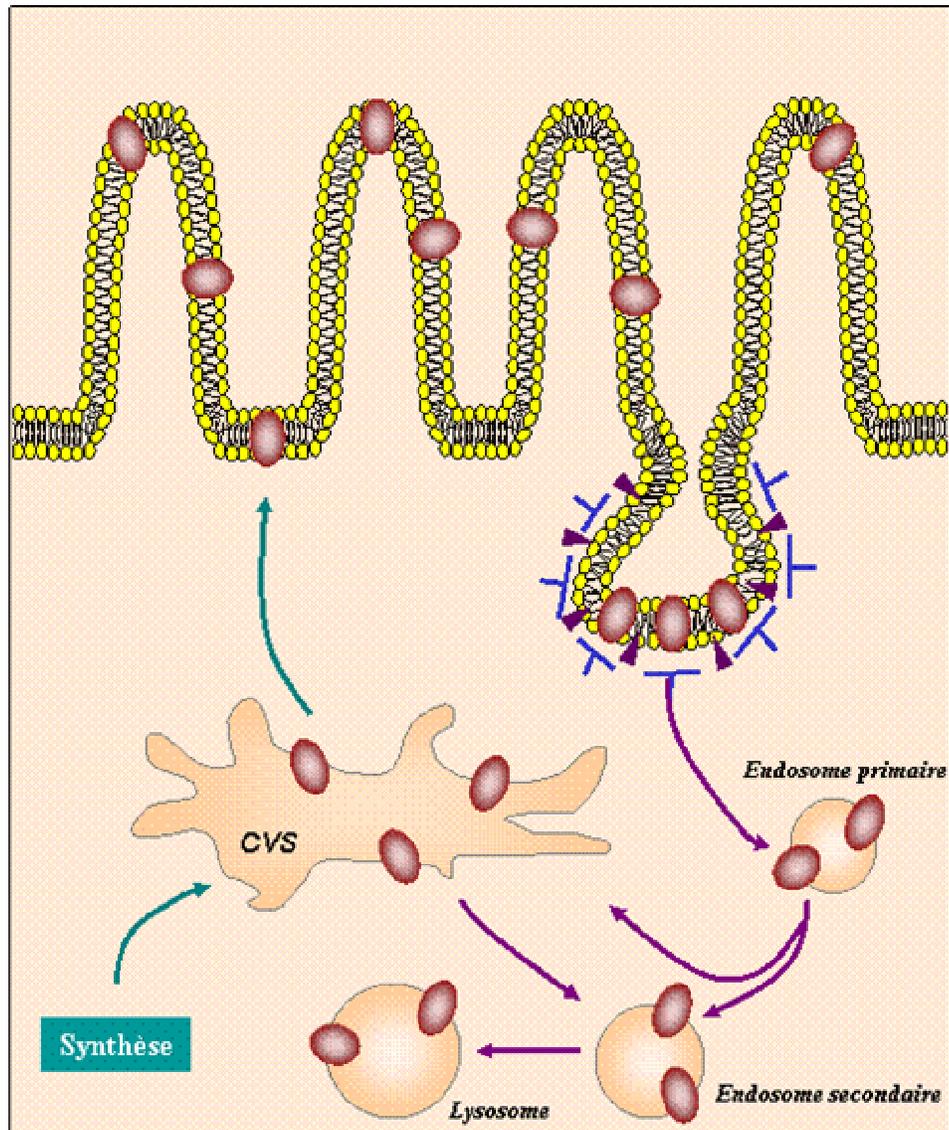
### **V.2/- Rôle des processus endo- et exocytiques dans la régulation de la réabsorption rénale du Pi (figure 21)**

Les modifications tubulaires proximales induites par les facteurs de régulation (PTH, Pi, calcitonine, GH ...) sont généralement doubles et font intervenir des mécanismes endo- et exocytiques. Qu'il s'agisse d'une inhibition ou d'une activation de la réabsorption du Pi, ces modifications sont dans un premier temps associées à une rétro-régulation négative ou positive, rapide et spécifique, de la densité membranaire apicale en protéine NaPi IIa. Celle-ci s'effectue sans altération du niveau de transcription de la protéine (Levi M, 1994). Cependant, lorsque l'exposition hormonale ou l'exposition aux faibles/fortes concentrations en Pi est prolongée, il en résulte alors une modification du niveau de transcription du gène codant pour le cotransporteur NaPi IIa. Mis à part dans certains cas bien précis (vitamine D par exemple), cette altération étant généralement de faible amplitude, ce phénomène ne joue donc pas un rôle majeur dans les processus de régulation du transporteur.



**Figure 20 : Modèle cinétique du système NaPi IIa.**

A l'état de repos, le cotransporteur NaPi IIa possède une charge négative (-1) dans une conformation structurale permettant la liaison d'un ion Na<sup>+</sup> (1). L'interaction entre le premier ion Na<sup>+</sup> et le cotransporteur induit un changement de conformation qui libère le site de fixation au Pi (2). La fixation du Pi engendre alors un nouveau changement de conformation et permet la liaison de 2 nouveaux ions Na<sup>+</sup> (3), à l'origine de la translocation du cotransporteur de la face externe vers la face interne de la membrane plasmique (4 et 4'). Il s'ensuit la redistribution de 2 ions Na<sup>+</sup> et du Pi dans le milieu cytoplasmique (5) puis du dernier ion Na<sup>+</sup>. Le cotransporteur revient ainsi à son état initial (6) et peut entamer un nouveau cycle.



**Figure 21 · Rôle des processus endo- et exocytiques dans le contrôle de l'activité NaPi IIa.**

L'activité du cotransporteur NaPi IIa est régulée par de nombreux facteurs hormonaux et non-hormonaux. Cette régulation s'effectue *via* le contrôle de la densité membranaire en protéine ( $V_{max}$ ) qui s'effectue par la stimulation et/ou l'inhibition des processus endo- (violet) et exocytiques (vert). Ainsi, la stimulation de la réabsorption du  $P_i$  est associée à un transfert par exocytose des cotransporteurs NaPi IIa néo-synthétisés à partir d'un compartiment vacuolaire subapical (CVS) ; et l'inhibition de transport est associée à une internalisation des cotransporteurs *via* l'endocytose clathrine-dépendante.

### **V.2.1/- Rétro-régulation négative du transport**

Le mécanisme par lequel le cotransporteur NaPi IIa est négativement rétro-régulé par un processus endocytique, peut être étudié *in vivo* et *in vitro* de 2 façons : la première étant l'inhibition du cotransport par l'administration de PTH, et la seconde étant l'exposition des cellules épithéliales à de fortes concentrations en Pi (Kempson *et al*, 1990 et 1995 ; Lotscher *et al*, 1996 et 1999). Bien qu'*in fine* le résultat soit similaire, c'est-à-dire une réduction de la réabsorption du Pi, les processus cellulaires et les partenaires impliqués (protéines associées et/ou adaptatrices) sont néanmoins spécifiques de chacune des voies de signalisation empruntées et seront discutés dans le paragraphe V.3.

Même si l'implication de l'endocytose clathrine-dépendante (cf chapitre III) dans les processus de rétro-régulation négative de l'activité NaPi membranaire a longtemps été suggérée au sein de la communauté scientifique, ce n'est cependant que très récemment que ce mécanisme a été mis en évidence (Traebert *et al*, 2000). Ainsi, 15 minutes après l'injection de PTH (1-34) chez le rat, l'inhibition du cotransport rénal régulé par NaPi IIa s'accompagne d'une internalisation de la protéine dans des vésicules tapissées de clathrine. Ces dernières sont issues du bourgeonnement des invaginations membranaires, formées au centre de 2 microvillosités, et au niveau desquelles le cotransporteur interagit avec la protéine adaptatrice AP-2 (Traebert *et al*, 2000), un des facteurs de régulation de l'endocytose. Or, bien que NaPi IIa comporte plusieurs motifs peptidiques -LL- et -YXRF- dans sa séquence primaire (Hernando *et al*, 1999 et 2000), le domaine peptidique précis gouvernant l'interaction entre le cotransporteur et AP-2 n'est pas encore connu. Il semblerait néanmoins que le motif dileucine (-LL-) localisé dans la dernière boucle intracellulaire (IL-3) joue un rôle crucial dans l'internalisation de NaPi IIa (Karim-Jimenez *et al*, 2001).

### **V.2.2/- Rétro-régulation positive du transport**

De manière identique à la détermination du rétro-contrôle négatif, le mécanisme par lequel le co-transporteur NaPi IIa est positivement rétro-régulé par exocytose peut être caractérisé après une première période d'adaptation des cellules tubulaires proximales à de fortes concentrations en Pi, ce qui provoque une diminution de l'expression membranaire de la protéine, puis d'une exposition rapide à

de faibles concentrations (Levi *et al*, 1994 ; Lotscher *et al*, 1997). Il en résulte une augmentation de la densité membranaire en NaPi IIa à la suite de la réinsertion de la protéine à partir d'un compartiment vacuolaire subapical (Pfister *et al*, 1998). Cette adaptation, rapide et spécifique, est accomplie dans un premier temps sans modification du niveau de transcription du gène codant pour le cotransporteur (Levi *et al*, 1994 ; Pfister *et al*, 1998). Cependant, lorsque l'exposition des cellules aux faibles concentrations en Pi est prolongée au-delà de plusieurs heures, il peut alors être observé une élévation de la concentration intracellulaire en  $Ca^{2+}$  (Saxena *et al*, 1996), qui en retour induit une stabilisation de l'ARNm NaPi IIa (Moz *et al*, 1999) et une activation de la synthèse de *novo* protéines (Malmstrom et Murer, 1987 ; Biber *et al*, 1988 ; Pfister *et al*, 1998). Ces dernières sont alors dirigées vers le compartiment vacuolaire subapical, puis insérées dans les membranes apicales de l'épithélium par un processus exocytique, fonctionnellement dépendant de l'état du réseau microtubulaire (Hansh *et al*, 1993 ; Lötscher *et al*, 1997).

### **V.3/- Voies de signalisation intracellulaire impliquées dans ...**

#### **V.3.1/- ... la rétro-régulation négative induite par la PTH**

##### **V.3.1.1/- Activation de l'endocytose des cotransporteurs NaPi IIa (figure 22a)**

Comme nous l'avons déjà vu précédemment, la PTH et les peptides de type PTH (PTHrP) sont des hormones endocrines, sécrétées par la parathyroïde, et dont l'action phosphaturique est la résultante d'un processus cellulaire complexe, et déclenchée par l'activation des récepteurs PTHrRs. Ces derniers, dont la localisation est à la fois basolatérale et apicale au sein de l'épithélium tubulaire proximal, appartiennent à la super-famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), et sont associés aux protéines  $G_{\alpha q}$  et  $G_{\alpha s}$  (Chase et Aurbach, 1967 ; Imbert, 1975 ; Chabardès *et al*, 1975a, 1975b et 1980 ; Malmstrom *et al*, 1986, 1987, 1988 ; Cole *et al*, 1987 et 1988 ; Quamme *et al*, 1989a, 1989b et 1989c ; Reshkin *et al*, 1990 et 1991 ; Kaufmann *et al*, 1994).

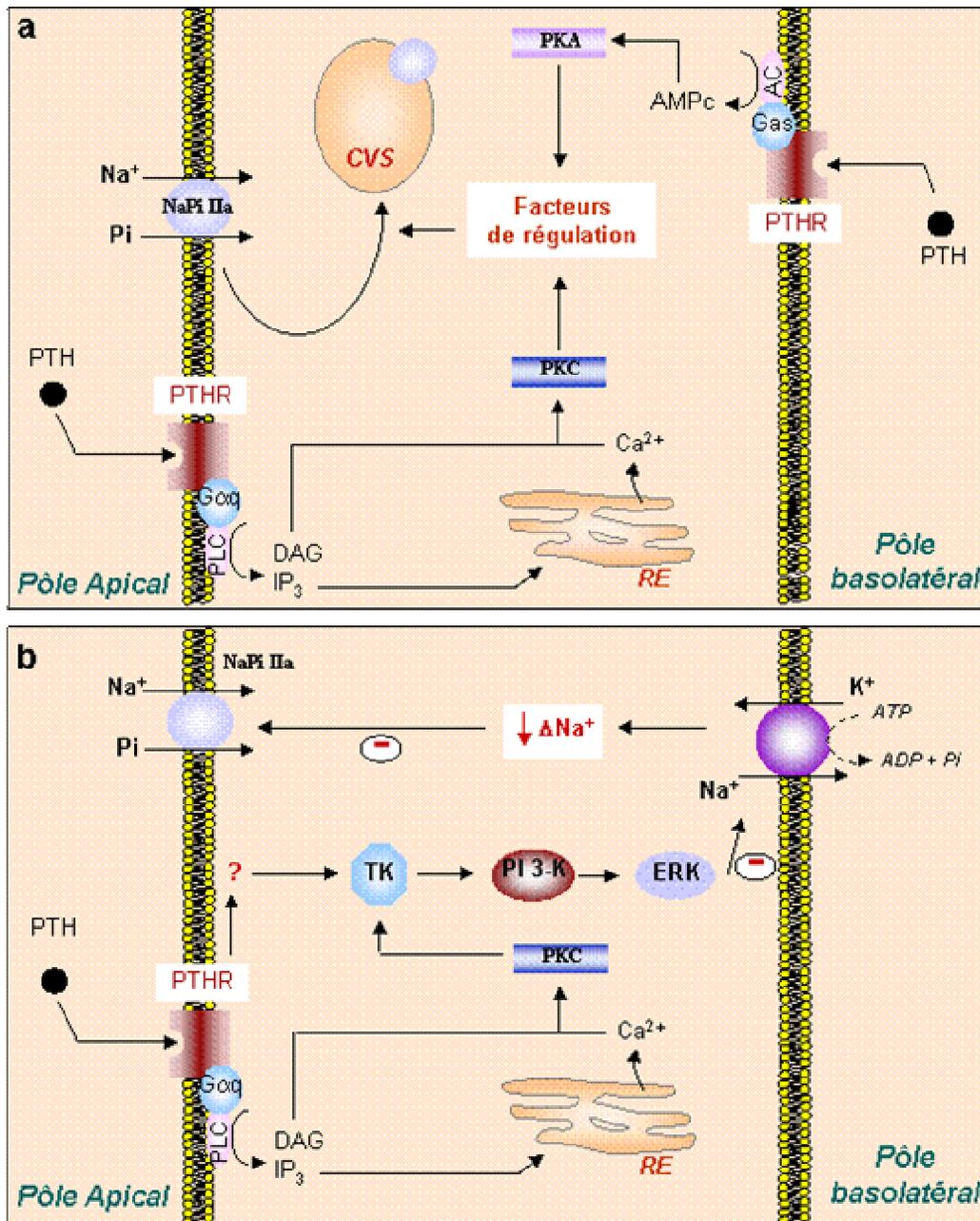
La liaison de l'hormone à son récepteur déclenche l'activation de ce dernier, qui par l'intermédiaire des protéines  $G_{\alpha q}$  et de  $G_{\alpha s}$ , engendre la stimulation de 2 enzymes membranaires, celles-ci étant respectivement la phospholipase C (PLC) (Meltzer *et al*, 1982) et l'adénylate cyclase (AC) (Abu-Samba *et al*, 1992). Tandis que

l'activation de la PLC engendre la production d'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) et de diacylglycérol (DAG), dont la fonctionnalité correspond à la stimulation des protéines kinases du type C (PKC) (Meltzer *et al*, 1982 ; Hruska *et al*, 1987 ; Abu-Samba *et al*, 1992), l'activation de l'adénylate cyclase induit quant à elle la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), responsable de la stimulation des protéines kinases du type A (PKA) (Abu-Samba *et al*, 1992). Il en résulte, *in fine*, le déclenchement de l'endocytose du cotransporteur, c'est-à-dire la rétro-régulation négative de la densité membranaire en protéine NaPi IIa, et ainsi une réduction de 70% de la réabsorption du phosphate. De manière intéressante, l'étude à l'échelle moléculaire de ces 2 voies de signalisation intracellulaire à l'aide d'analogues tronqués de l'hormone parathyroïdienne, PTH(1-34) et PTH(3-34), a permis de mettre en évidence une interdépendance entre les fonctions de PKC et de PKA (Cole *et al*, 1987 et 1988 ; Lederer *et al*, 1998 ; Pfister *et al*, 1999 ; Traebert *et al*, 2000), et l'existence d'un mécanisme de régulation asymétrique (Traebert *et al*, 2000). En effet, la réponse cellulaire induite par l'analogue PTH(3-34), qui interagit exclusivement avec les récepteurs apicaux de l'hormone parathyroïdienne des cellules tubulaires proximales, ne concerne que la voie de signalisation intracellulaire PLC/PKC et se traduit par une réduction de 50% de l'effet induit par l'analogue PTH(1-34) (Cole *et al*, 1987 et 1988 ; Lederer *et al*, 1998 ; Pfister *et al*, 1999). Au contraire, l'analogue PTH(1-34), qui est capable d'interagir à la fois avec les récepteurs apicaux et basolatéraux de l'hormone parathyroïdienne, engendre un effet comparable à celui de l'hormone parathyroïdienne et stimule simultanément les cascades enzymatiques PLC/PKC et AC/PKA. D'après ces observations, il semblerait donc que les récepteurs apicaux de l'hormone parathyroïdienne soient couplés aux protéines G $\alpha$ q et à la voie PLC/PKC, et que les récepteurs basolatéraux soient couplés aux protéines G $\alpha$ s et à la cascade signalétique AC/PKA (Traebert *et al*, 2000).

Les mécanismes cellulaires par lesquels les protéines kinases C et A génèrent l'inactivation des cotransporteurs NaPi IIa par endocytose demeurent inconnus à ce jour. Néanmoins, PKC et PKA sont des sérine/thréonine kinases, qui comme leur nom l'indique, catalysent une réaction de phosphorylation de résidus spécifiques (les résidus sérine et thréonine contenus dans la séquence -RRXS- pour PKA par exemple) (pour revue : Walsh et Van Patten, 1994), et sont impliquées dans la

désensibilisation hétérologue de nombreux récepteurs membranaires par un processus endocytique. De manière logique, il peut donc être suggéré que l'endocytose de NaPi IIa, induite par l'activation de la protéine kinase A et de la protéine kinase C, résulte soit de la phosphorylation de résidus sérine ou thréonine contenus dans la séquence primaire du cotransporteur, soit de l'activation et/ou de l'inactivation par phosphorylation de protéines adaptatrices et/ou régulatrices impliquées dans l'endocytose et dans la régulation de NaPi IIa. Or, bien que le cotransporteur NaPi IIa possède de nombreux sites consensus de phosphorylation (Magagnin *et al*, 1993 ; Hayes *et al*, 1995), il n'a jamais pu être démontré expérimentalement que la rétro-régulation négative du cotransporteur s'accompagne d'une phosphorylation de l'un de ces sites. De manière identique, la suppression de ces domaines par mutagenèse dirigée ne modifie pas l'activité du cotransporteur (Hayes *et al*, 1995). Il est donc proposé que la régulation par les protéines kinases A et C de la densité membranaire en protéine NaPi IIa s'effectue par l'intermédiaire de l'activation et/ou l'inhibition de protéines associées.

De manière intéressante, la partie C-terminale de NaPi IIa contient les informations essentielles qui gouvernent sa distribution cellulaire, qu'elle soit membranaire ou cytoplasmique. En outre, les 3 derniers résidus de sa séquence, -TRL-, sont fortement conservés parmi les nombreux isoformes NaPi IIa jusqu'ici répertoriés et s'identifient à un domaine capable d'interagir avec des protéines de type PDZ (Gisler *et al*, 2001), c'est-à-dire des protéines dont la séquence primaire contient un module PDZ. Ces modules qui correspondent à des séquences spécifiques de 100 acides aminés (Fanning et Anderson, 1996), appartiennent à une classe particulière de protéines submembranaires, interagissent avec le cytosquelette cellulaire et contribuent au maintien des protéines à la membrane (Kornau *et al*, 1997). Parmi les protéines de type PDZ qui interagissent avec le cotransporteur NaPi IIa, on retrouve le facteur de régulation de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  NHE3, NHERF pour «  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger regulating factor » (Weinman *et al*, 1995), et la protéine Diphor-1 (Custer *et al*, 1997 ; White *et al*, 1998) qui partage une forte homologie de séquence avec NHERF. Ainsi, puisque NHERF est un membre de la famille ezrine-radixine-moesine, connu pour jouer un rôle essentiel dans la liaison entre la membrane plasmique et les filaments d'actine contenus au sein des microvillosités (Bretscher, 1983 ; Reczek *et al*, 1997), et que le cytosquelette d'actine



**Figure 22 : Mécanisme d'inactivation du transport de Pi par la PTH.**

Le processus d'inhibition de la réabsorption du Pi par la PTH est double : *via* l'activation croisée des voies Gαq/PLC/DAG-IP<sub>3</sub>/PKC et Gαs/AC/AMPc/PKA qui conduisent à l'endocytose du cotransporteur NaPi IIa (a), et *via* l'activation de la voie TK/PI 3-K/ERK qui engendre, entre autre, l'inhibition de la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase (b) Cette inhibition s'accompagne d'une accumulation intra-cytoplasmique du Na<sup>+</sup> qui en retour engendre une inhibition de l'activité de transport du Pi. Les abréviations sont : Protéine kinase A (PKA) et C (PKC) ; Hormone parathyroïdienne (PTH) ; Récepteur à l'hormone parathyroïdienne (PTHR) ; Protéine G (G) ; Phospholipase C (PLC) ; Adénylate cyclase (AC) ; Inostol triphosphate (IP<sub>3</sub>) ; Gacylglycérol (DAG) ; Adénosine monophosphate cyclique (AMPc) ; Réticulum endoplasmique (RE) ; Compartiment vacuolaire subapical (CVS) ; Tyrosine kinase (TK) ; Phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K) ; Kinase régulée par les signaux extracellulaires (ERK)

est directement impliqué dans la machinerie endocytaire, ce facteur est une cible potentielle de phosphorylation par les protéines kinases A et/ou C.

#### *V.3.1.2/- Effet indirect de la PTH (figure 22b)*

En 1994, il a été établi l'existence d'un lien direct entre la stimulation des récepteurs de l'hormone parathyroïdienne et l'activation de kinases particulières, appartenant à la famille des « mitogen-activated protein kinases » (MAPKs): les ERKs pour « extracellular signal-regulated kinase » (Quamme *et al*, 1994). A partir de ces travaux, il a été mis en évidence que l'activation des ERKs participe au rétro-contrôle négatif du cotransporteur NaPi IIa induit par l'hormone parathyroïdienne, et que la voie de signalisation cellulaire impliquée est partiellement indépendante des cascades enzymatiques classiques PLC/PKC et AC/PKA. Les travaux conduits par Lederer ont permis l'identification de plusieurs partenaires protéiques impliqués dans cette voie de signalisation et ont mis en évidence que l'inhibition du cotransport NaPi contrôlé par ERK *via* l'hormone parathyroïdienne fait intervenir 2 cascades enzymatiques distinctes et décalées dans le temps (Lederer *et al*, 2000) : la première étant indépendante de l'activation de la protéine kinase C et protéine kinase A par la l'hormone, et la seconde étant en revanche contrôlée par l'activation de PKC. Or, quelle que soit la cascade enzymatique empruntée, les inhibitions de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) et de la tyrosine kinase (TK) suppriment l'activation de ERK par la l'hormone parathyroïdienne, ce qui suggère que la stimulation de ERK par cette dernière s'effectue *via* l'activation de la phosphatidylinositol 3-kinase et de la tyrosine kinase.

Comme son nom l'indique, la phosphatidylinositol 3-kinase est responsable de la phosphorylation en position 3 du phosphatidylinositol, lequel est impliqué dans la régulation de nombreux processus cellulaires dont l'endocytose (Brunskill *et al*, 1998). La tyrosine kinase gouverne quant à elle la phosphorylation de résidus "tyrosine" spécifiques de certaines protéines cytoplasmiques, et est un facteur de régulation impliqué dans de nombreuses cascades de signalisation intracellulaire. A ce jour, bien que les mécanismes cellulaires exacts par lesquels ces 2 kinases altèrent l'activité membranaire du cotransporteur NaPi IIa restent non identifiés, il semblerait qu'elles participent au processus de régulation de la réinsertion membranaire de ces protéines à partir du compartiment vacuolaire subapical (Jehle

*et al*, 1998 ; Pfister *et al*, 1999). D'autre part, puisque l'activation de PKC et de ERK par la l'hormone parathyroïdienne conduit également à l'inhibition de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (Ribeiro *et al*, 1992 ; Lederer *et al*, 1998 ; Khundmiri et Lederer, 2002), localisée au pôle basolatéral des cellules tubulaires proximales, il est également suggéré que les cascades signalétiques TK/PI 3-kinase/ERK et PKC/TK/PI 3-kinase/ERK produisent *in fine* une réduction de l'activité  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. L'inhibition de cette dernière, dont la fonction est le maintien du gradient électrochimique en  $\text{Na}^+$ , provoquerait ainsi une inhibition indirecte du cotransporteur NaPi IIa.

### **VI.3.2/- ... L'adaptation aux variations de concentration en Pi**

*In vivo*, les mécanismes mis en jeu dans l'altération du taux d'expression membranaire de la protéine NaPi IIa en réponse aux variations extracellulaires en Pi sont rapides (Portale *et al*, 1987 ; Levi *et al*, 1994 et 1996 ; Lotscher *et al*, 1997 ; Pfister *et al*, 1998) et doivent très certainement être multiples. A partir de leurs travaux *in vitro* qui démontrent que l'adaptation n'est efficace que lorsque la modification de la concentration en Pi est réalisée au pôle apical des cellules (Reshkin *et al*, 1990 et 1991), les auteurs suggèrent qu'il existe à ce niveau un senseur membranaire au Pi. Bien que le mécanisme précis ne soit pas encore connu, le senseur calcique ou récepteur au calcium (CaR) semble être un candidat potentiel. Ce dernier, un membre de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), est en effet localisé au pôle apical des cellules épithéliales de la bordure en brosse (Riccardi *et al*, 1998 ; Brown *et al*, 1998 ; Riccardi *et al*, 1998) et participe au contrôle et au maintien de l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  dont la régulation est étroitement liée à celle du Pi. Cette hypothèse est d'autant plus pertinente que l'élévation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  plasmatique chez un modèle de rat parathyroïdectomisé génère une inhibition de la réabsorption tubulaire proximale du Pi. Ces résultats indiquent par conséquent que le  $\text{Ca}^{2+}$  lui-même est capable d'altérer le transport du Pi indépendamment du taux sérique en hormone parathyroïdienne (Kuhtzinger *et al*, 1976). Il est intéressant de noter que la stimulation des senseurs calciques provoque également, *via* la stimulation des protéines  $\text{G}\alpha_q$ , l'activation de ERK (Kifor *et al*, 2001), et de la phospholipase C (Handlogten *et al*, 2001), qui, comme nous l'avons vu précédemment dans le paragraphe V.3.2.2, sont 2 facteurs cellulaires distincts qui régulent l'activité des cotransporteurs NaPi IIa.

## MATERIELS ET METHODES

### **I/ Modèles cellulaires d'étude *in vitro*.**

L'étude du (des) mécanisme(s) à l'origine de la réabsorption tubulaire proximale et de la cytotoxicité de l'uranium a été effectuée en faisant appel à deux lignées cellulaires. La première, d'origine tubulaire proximale de rein de porc Hampshire est la lignée LLC-PK<sub>1</sub> (Hull *et al*, 1976). La seconde, d'origine tubulaire distale de rein de chien, est la lignée cellulaire MDCK (Gausch *et al*, 1966) transfectée avec l'ADN complémentaire (ADNc) codant pour le co-transporteur sodium-dépendant du phosphate rNaPi-2. L'objectif de ce paragraphe est de décrire les caractéristiques fonctionnelles de ces deux lignées cellulaires et les raisons de leur choix dans le cadre de notre étude.

#### **I.1/ La lignée cellulaire LLC-PK<sub>1</sub>.**

Les cellules LLC-PK<sub>1</sub> proviennent de l'European Collection of Cell Culture (ECACC, Salisbury, Wiltshire, UK) et ont été utilisées entre le 1<sup>er</sup> et le 20<sup>ème</sup> passage après réception, soit entre le 206<sup>ème</sup> et le 226<sup>ème</sup> passage. Le choix de cette lignée cellulaire dans le cadre de notre étude repose sur deux critères : le premier étant que la cible rénale principale de l'uranium est l'épithélium tubulaire proximal, et le second étant que la totalité des études qui ont été précédemment réalisées l'ont été à l'aide de cette lignée cellulaire.

Une fois en culture, dans des conditions particulières, les cellules LLC-PK<sub>1</sub> sont polarisées. Elles présentent un pôle apical et un pôle basolatéral, séparés entre eux par l'intermédiaire de jonctions serrées. La membrane située au pôle apical est caractérisée par la formation de microvillosités qui se projettent dans le milieu extracellulaire (Toutain et Morin, 1992). Elles forment également spontanément des dômes qui résultent de la caractéristique de ces cellules à présenter une activité de transport trans-cellulaire très importante (Gstraunthaler *et al*, 1985). Il s'agit d'autre part d'une lignée cellulaire de type épithélial qui possède un grand nombre de caractéristiques fonctionnelles appartenant aux cellules tubulaires proximales (Gstraunthaler *et al*, 1985). Cependant, bien que ces cellules soient largement

employées dans les études de caractérisation et de détermination des processus impliqués dans la toxicité tubulaire proximale des métaux tel que le cadmium, elles diffèrent de l'épithélium proximal à plusieurs niveaux. L'un d'entre eux correspond au profil de réponse hormonal. Par exemple, la lignée cellulaire LLC-PK<sub>1</sub> n'exprime pas de récepteur à l'hormone parathyroïdienne (Meier *et al*, 1985), qui est pourtant le facteur de régulation hormonal majeur du processus de réabsorption du phosphate *in vivo*. D'autre part, puisque ces cellules répondent à la vasopressine et à la calcitonine, responsables de l'activation de l'adénylate cyclase et de la production d'AMPc intracellulaire, la lignée LLC-PK<sub>1</sub> peut être également assimilée à une origine compatible avec celle des cellules de la branche ascendante de l'anse de Henlé. Il n'en demeure pas moins que la lignée cellulaire LLC-PK<sub>1</sub> reste un outil de choix pour l'étude des néphropathies induites par les xénobiotiques. L'ensemble des propriétés fonctionnelles des cellules LLC-PK<sub>1</sub> sont répertoriées dans le **tableau VI**.

### **I.2/-La lignée cellulaire MDCK transfectée.**

Les cellules MDCK transfectées avec l'ADNc codant pour le co-transporteur rNaPi-2, un isoforme de la sous-famille des co-transporteurs NaPi de type IIa, proviennent d'un don de la part du Docteur Heini Murer et du Docteur Jürg Biber de l'Université de Zürich. De la même manière que les cellules LLC-PK<sub>1</sub>, la lignée cellulaire MDCK a été utilisée entre le 1<sup>er</sup> et le 20<sup>ème</sup> passage après sa mise en culture, ce qui correspondait aux passages 182 et 202. Cette lignée cellulaire, d'origine tubulaire distale, a été choisie dans le cadre de l'étude du rôle des co-transporteurs sodium-dépendant du phosphate (NaPi) vis-à-vis de la toxicité de l'uranium. Bien que cette lignée cellulaire possède un système endogène de transport de type NaPi, elle n'exprime cependant pas le co-transporteur NaPi de type IIa (Quabius *et al*, 1996), lequel est principalement exprimé au niveau de l'épithélium tubulaire proximal et représente le composant membranaire majeur à l'origine de la réabsorption du phosphate *in vivo*. Le second critère, qui nous a conduit à choisir cette lignée cellulaire génétiquement modifiée dans le cadre de notre étude repose sur le fait que l'expression du gène codant pour le co-transporteur rNaPi-2 est sous le contrôle d'un promoteur inductible à la dexaméthasone. De la sorte, il nous a alors été possible de caractériser le rôle de ce type de co-transporteurs vis-à-vis de la

<i>Propriétés hormonales</i>	<i>Références</i>
ANF	Inui et al, 1985
Calcitonine	Ausiello et al, 1980
EGF/IGF	Goodyear et Kachra, 1985 ; Wei et al, 1991
Hydrocortisone	Chuman et al, 1982
Insuline	Roy et al, 1980
Oxytocine	Stassen et al, 1988
Hormone Thyroïdienne	Chuman et al, 1982
Vasopressine (V <sub>1</sub> , V <sub>2</sub> )	Ausiello et al, 1987
Vitamine D	Costa et al, 1987
Angiotensine II	Wolf et al, 1993
ANP	Hashimoto et al, 1994
Prostaglandine (PGE <sub>2</sub> )	Weber et al, 1997
Aldostérone	Ueda et al, 1992

<i>Propriétés de transport</i>	<i>Références</i>
Na <sup>+</sup> /glucose	Mullin et al, 1980
Na <sup>+</sup> /acides aminés	Rabito et Karish, 1983a et 1983b
Na <sup>+</sup> -indépendant acides aminés	Sepulveda et Pearson, 1985
Na <sup>+</sup> /phosphate	Rabito, 1983
Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>	Shugrue et al, 1999 ; Cantiello et al, 1986
Na <sup>+</sup> /nucléobases	Griffith et Jarvis, 1993
Cl <sup>-</sup> /HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Chaillet et al, 1989
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> /2Cl <sup>-</sup>	Brown et Murer, 1985
Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>	Paris et al, 1986
H <sup>+</sup> /TEA	Fauth et al, 1988
Transport conjugué à la S-cystéine	Schaeffer et Stevens, 1986
Urate/PAH	Spitzenberger et al, 2000
Mégaline (Endocytose)	Nielsen et al, 1998 et 2001
H <sup>+</sup> /peptide	Wenzel et al, 1998
Canal calcique régulé par le récepteur P2X	Filipovic et al, 1998
Transporteur de cations organiques	Grundermann et al, 1997
Canal potassique régulé par l'ATP	Filipovic et Reeves, 1997

**Tableau VI : Caractéristiques fonctionnelles des cellules LLC-PK<sub>1</sub>.**

cytotoxicité et du transport de l'uranium par comparaison des résultats obtenus sur le modèle MDCK transfecté mais non stimulé et le modèle MDCK sur-exprimant le co-transporteur rNaPi-2.

La lignée cellulaire MDCK possède une activité enzymatique caractéristique de la bordure en brosse beaucoup moins importante que celle qui est exprimée par les cellules LLC-PK<sub>1</sub>. Elles expriment cependant une activité Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase beaucoup plus intense, ce qui semble correspondre avec une origine tubulaire distale (Gstraunthaler *et al*, 1985). Cela a notamment été confirmé par l'intermédiaire de la production d'anticorps monoclonaux anti-MDCK qui, lorsque ceux-ci ont été injectés chez le chien, interagissent avec les membranes des cellules appartenant à la branche ascendante de l'anse de Henlé et du tubule contourné distal (Herzlinger *et al*, 1982). D'autre part, de manière identique aux cellules tubulaires distales, les cellules MDCK n'expriment pas de systèmes de transport sodium-dépendant au glucose (Rindler *et al*, 1979) et possèdent la capacité d'acidifier ou d'alcaliniser le milieu extracellulaire au niveau de leur pôle apical (Husted *et al*, 1986). Enfin, leur profil de réponse au stimulus hormonal reflète également une origine tubulaire distale. Elles répondent d'une part à la vasopressine par la production d'AMPc, mais ne répondent pas, d'autre part, ni à l'hormone parathyroïdienne, ni à la calcitonine (Meier et Insel, 1985).

## **II/-Culture cellulaire**

### **II.1/ Congélation des cellules.**

Dans le but de maintenir dans notre étude un pool cellulaire qui présente un nombre de repiquages restreints, ceci afin de minimiser le risque d'une dérive phénotypique, les cellules sont conservées par cryo-préservation. Pour cela, les cellules en phase exponentielle de croissance sont détachées de la boîte ou du flacon de culture à l'aide d'un grattoir de cellules (*cell scraper*), homogénéisées à la seringue de 5 ml par 3 allers-retours dans du milieu de culture (MEM M5650 : Sigma<sup>®</sup>) additionné de 20% de sérum de veau fœtal (SVF : Sigma<sup>®</sup>), lequel est préalablement décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes. Les cellules sont ensuite réparties dans des cryo-tubes de 1.5 ml (Greiner<sup>®</sup>) à une densité de 10<sup>6</sup> cellules par cryo-tube. Le volume est complété par du milieu de culture contenant 20% de SVF et

un agent cryo-protecteur, le diméthylsulfoxyde ou DMSO (Sigma®), à une concentration finale de 10%. Les homogénats cellulaires sont alors placés à  $-20^{\circ}\text{C}$  dans un récipient contenant du propanol-2 (cryofreeze®) pendant 30 minutes, puis à  $-80^{\circ}\text{C}$  pendant 1 heure, et enfin à une température de  $-196^{\circ}\text{C}$  dans l'azote liquide pour une conservation à long terme. Le DMSO est un agent cryo-protecteur qui permet la prévention de la formation de cristaux de glace et le contrôle de la variation de la pression osmotique.

## **II.2/ Décongélation des cellules.**

La décongélation des cellules est effectuée de manière rapide dans le but d'éviter un contact trop prolongé des cellules avec le DMSO. Les cellules sont ainsi placées dans un bain-marie à  $37^{\circ}\text{C}$  jusqu'à la décongélation totale du milieu, puis transvasées dans un tube à centrifuger stérile de 15 ml (Sigma®). La suspension cellulaire est alors reprise dans un volume de 10 ml de milieu de culture, le tout centrifugé pendant 3 min à une vitesse de 800g. Cette étape a pour objectif l'élimination du DMSO. Le culot cellulaire est alors remis en suspension dans 5 ml de milieu de culture complémenté avec 20% de SVF, puis les cellules sontensemencées à une densité de  $10^6$  cellules par flacon de culture de  $75\text{ cm}^2$ . Ces derniers sont placés en atmosphère humide, composée de 5% de  $\text{CO}_2$  et 95% d'air, thermo-régulée à  $37^{\circ}\text{C}$ . Le lendemain, le milieu de culture est remplacé, et dans les jours qui suivent, le taux de sérum est progressivement diminué jusqu'à l'obtention d'un milieu de culture complémenté à 5% de SVF.

## **II.3/ Mise en culture et maintien de la culture cellulaire.**

Les cellules sont mise en culture dans des flacons de  $75\text{ cm}^2$  de surface (Greiner®) munis de bouchons filtrants  $0.22\ \mu\text{m}$ , lesquels sont placés dans un incubateur à  $37^{\circ}\text{C}$  en atmosphère composé de 5% de  $\text{CO}_2$  et 95% d'air. Le milieu de culture (MEM M5650 : Sigma®) est complété avec 10 mM d'HEPES, 1 mM de L-glutamine, 50 mg/l de streptomycine,  $10^4$  UI/l de pénicilline et de 10% de SVF préalablement décomplémenté à  $56^{\circ}\text{C}$  pendant 30 minutes. L'ensemble de ces produits a été obtenu chez Sigma®.

Le milieu de culture est remplacé tous les 3 jours, et les cellules sub-confluentes sont soit repiquées à une densité de  $10^6$  cellules par flacon pour

l'entretien de la lignée, soit remises en culture dans des plaques de micro-titration 96-puits (Sigma®) ou dans des boîtes de Pétri de 6 et de 10 cm de diamètre (Greiner®) pour les expérimentations. Les cellules sub-confluentes sont ainsi détachées des boîtes de culture par dissociation mécanique à l'aide d'un grattoir de cellules stérile (*cell scrapper*), homogénéisées par 3 allers-retours avec une seringue de 5 ml munie d'une aiguille de 2 mm de diamètre, et re-suspendues dans un volume défini de milieu de culture.

### **III/-Préparation des solutions d'uranium.**

Dans le cadre des études de cytotoxicité, nous avons dans un premier temps préparé des solutions mères en uranium(VI). Cette préparation repose sur les observations et travaux qui ont été préalablement effectués dans le laboratoire et qui ont permis de définir les conditions optimales pour la mise en solution de l'actinide (Mirto *et al*, 1999). La solution mère d'uranium a ainsi été obtenue par dissolution de cristaux de nitrate d'uranyle hexahydraté ( $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  : Merck Eurolab®) dans une solution aqueuse de bicarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ ) 0.1 mol/l, ceci afin d'obtenir une concentration finale en uranium de 0.01 mol/l. Cette solution a alors été placée sous agitation pendant 30 minutes, puis une gamme de concentrations variant de 8.9 à 0.89 mmol/l été réalisée en milieu bicarbonate 0.1 mol/l. Le pH de chacune des solutions a ensuite été ajusté à 7.2 par l'ajout de NaOH 1 mol/l. Le jour des expérimentations sur culture cellulaire, chaque solution-fille d'uranium a alors été re-diluée d'un facteur 8.9 dans du milieu de culture (MEM M5650 : Sigma®).

Dans le cadre des études de transport et d'accumulation d'uranium par les cellules, nous avons utilisé un traceur radio-actif de l'actinide : l'uranium 233 (CERCA, Pierrelatte). Ce dernier, dont la concentration initiale était de 8.87 mmol/l en milieu acide nitrique, a été directement dilué dans le milieu de culture les jours des expérimentations.

### **IV/ Etude de cytotoxicité : test de la lactate déhydrogénase (LDH).**

La mort cellulaire est classiquement évaluée par la quantification des dommages membranaires qui sont associés aux lésions. Or, le besoin de méthodes sensibles, quantitatives, répétables et reproductibles pour une détermination précise

du taux de mortalité cellulaire a conduit au développement de différentes techniques d'évaluation de la viabilité cellulaire. Parmi ces techniques, l'une des plus employées est basée sur la mesure de l'activité d'enzymes cytoplasmiques qui sont re-larguées dans le milieu extracellulaire par les cellules lysées. La lactate déshydrogénase (LDH) fait partie de ces enzymes cytoplasmiques. Son taux d'activité, déterminé dans le milieu extracellulaire, reflète ainsi parfaitement l'atteinte toxique générée par des substances cytotoxiques, ce qui est le cas de nombreux métaux tel que l'uranium (Mirto *et al*, 1999). La mesure de l'activité enzymatique de la LDH a été effectuée par un test colorimétrique commercialisé par Roche Diagnostics®.

#### **IV.1/ Principe du test.**

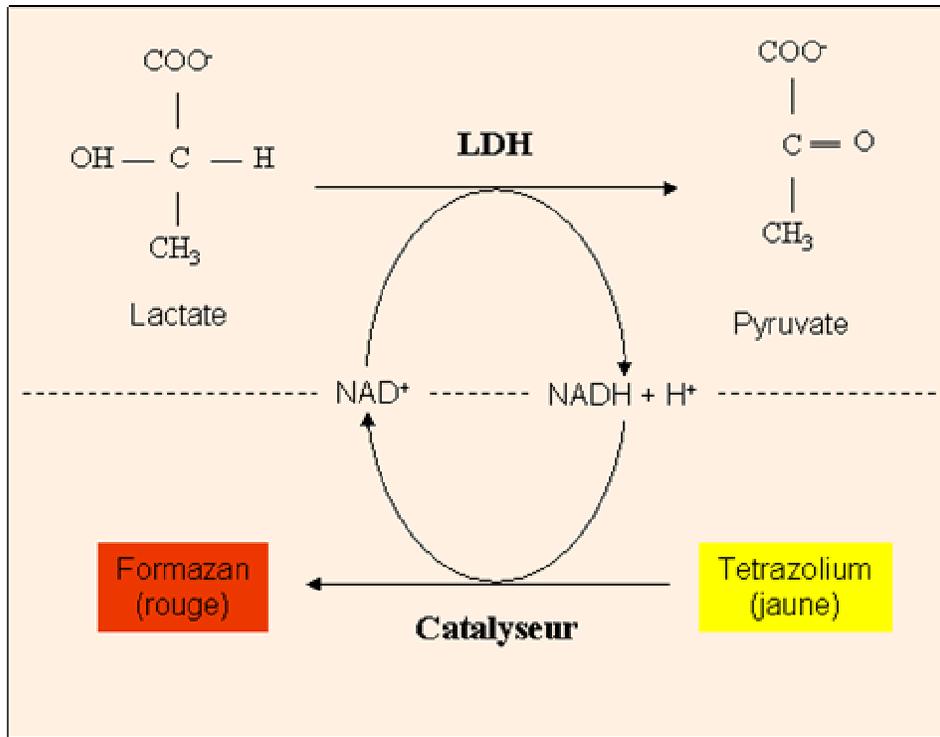
Comme l'indique la **figure 23**, la LDH catalyse la réaction de transformation du lactate en pyruvate en réduisant le nicotinamide désoxyribonucléotide ( $\text{NAD}^+$ ) en  $\text{NADH} + \text{H}^+$ . La formation de  $\text{NADH} + \text{H}^+$  est alors utilisée par le diaphorase pour catalyser la réaction de transfert des deux protons sur le sel de tétrazolium (de couleur jaune) qui est de la sorte réduit en un sel de formazan (de couleur rouge). L'amplitude de la formation de ces sels de formazan est ainsi directement proportionnelle au taux de LDH, et donc au taux de mortalité cellulaire, et peut être mesurée par spectrométrie d'absorbance à une longueur d'onde de 500 nm.

#### **IV.2/ Solutions vendues avec le kit de détection.**

Le kit de dosage de la LDH est vendu avec deux solutions. La première, appelé solution A, contient l'acide lactique et le  $\text{NAD}^+$ , tous deux lyophilisés, et que l'on re-solubilise dans 1 ml d'eau ultra-pure (Millipore®). La seconde, que l'on appellera solution B, contient les sels de tétrazolium, déjà solubilisés et prêts à l'emploi. Le jour du dosage, les solutions A et B sont mélangées extemporanément selon le rapport suivant : 500  $\mu\text{l}$  de la solution A sont additionnés à 22.500  $\mu\text{l}$  de la solution B pour réaliser 200 dosages. Le mélange résultant est appelé milieu réactionnel.

#### **IV.3/-Protocole expérimental.**

Pour ce type d'étude, les cellules sub-confluentes ont été mises en suspension dans un milieu nutritionnel classique supplémenté de 10% en SVF, puis mises en culture sur plaque de micro-titration 96 puits jusqu'à l'obtention de la



**Figure 23** : Principe du test de cytotoxicité par la mesure de l'activité de la LDH.

confluence. Les cellules ont alors été incubées pendant 2 heures dans un milieu nutritionnel classique en absence de SVF, afin que toutes les cellules entrent en phase  $G_0$  du cycle cellulaire avant l'expérimentation. Les cellules ont ensuite été intoxiquées pendant 24 heures dans un volume total de 200  $\mu$ l avec différentes concentrations en uranium, et en présence ou en absence des substances que nous avons testées. A la suite de cette période d'incubation, 100  $\mu$ l de milieu de culture ont été prélevés et transvasés sur une nouvelle plaque. On y a additionné 100  $\mu$ l du milieu réactionnel, et la micro-plaque a ensuite été placée à l'obscurité pendant 15 à 30 minutes selon le modèle cellulaire étudié. Après homogénéisation de la coloration, les densités optiques (DO) relatives à chaque puit ont enfin été mesurées par spectrophotométrie d'absorbance ( $\lambda_{\text{lecture}} = 492 \text{ nm} / \lambda_{\text{référence}} = 630 \text{ nm}$ ).

Afin de déterminer le taux de mortalité induit par l'uranium, nous avons réalisé au cours de chaque expérience deux types de contrôle : le premier, qui a été appelé "contrôle négatif", correspond à l'activité de la LDH spontanément re-larguée dans le milieu extracellulaire par les cellules (0% de mortalité); le second, que nous avons appelé "contrôle positif", correspond à l'activité maximale mesurable qui est obtenue lorsque le taux de mortalité cellulaire est lui-même maximal (100% de mortalité). Le contrôle négatif a ainsi été déterminé par l'incubation des cellules dans un milieu de culture identique à celui qui a été utilisé pour tester la cytotoxicité de l'uranium, mais en absence de l'actinide. Le contrôle positif a quant à lui été déterminé par le traitement des cellules avec 1% de Triton X-100 (Sigma®), un détergent responsable de la saponification des membranes. Le taux de mortalité cellulaire, exprimé en pourcentage, a pu ainsi être établi à partir de la relation suivante :

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = \frac{[\text{DO}_{(\text{échantillon})} - \text{DO}_{(\text{contrôle négatif})}]}{[\text{DO}_{(\text{contrôle positif})} - \text{DO}_{(\text{contrôle négatif})}]}$$

## **V/ Etude du transport de l'albumine-fitc, du phosphate et de l'uranium**

### **V.1/ Etude de l'endocytose de l'albumine.**

Lorsque nous avons étudié le processus endocytique clathrine-dépendant de l'albumine, les cellules ont été mises en culture jusqu'à l'obtention de la confluence

dans des boîtes de Pétri de 6 cm de diamètre (Merck Eurolab®). Le matin précédant l'étude, le milieu de culture nutritionnel a été remplacé par du milieu neuf en absence de SVF, et les cellules ont été incubées pendant 2 heures à 37°C en atmosphère humide composé de 5% de CO<sub>2</sub> et de 95% d'air. Après trois lavages acide avec 2 ml d'une solution Ringer (Gibco®) à pH 6.0, les cellules ont ensuite été incubées avec 3 ml de cette même solution, à pH 7.4 et contenant différentes concentrations en albumine conjuguée à la fluorescéine isothiocyanate (albumine-fitc : Sigma®), un marqueur de l'endocytose clathrine-dépendante. Les cellules ont ensuite été lavées 6 fois avec 2 ml de tampon Ringer (pH 7.4), afin d'enlever la fraction non-liée de l'albumine-fitc, puis reprises dans 1 ml d'un tampon de lyse (40 mmol/l de MOPS à pH 7.4 et 0.1% de Triton X-100). Les cellules ont alors été placées sous agitation à l'obscurité pendant 2 heures. Une fois les échantillons homogénéisés, nous avons enfin déterminé la concentration protéique par la méthode de Bradford et quantifié l'émission de fluorescence par spectrofluorimétrie ( $\lambda_{\text{excitation}} = 495 \text{ nm}$  /  $\lambda_{\text{émission}} = 520 \text{ nm}$ ) à l'aide du spectrofluorimètre FLX 800 (Bio-Tek®). La fraction d'albumine-fitc internalisée a été déterminée par la soustraction de la quantité d'albumine-fitc liée à la membrane, mesurée en présence d'un excès d'albumine non marquée, à la quantité totale d'albumine-fitc.

## **V.2/ Mesure du taux de transport sodium-dépendant du phosphate**

Comme précédemment, une fois la confluence cellulaire atteinte, les cellules ont été lavées par 2 fois avec 2 ml de tampon Ringer (pH 7.4) puis équilibrées dans 3 ml de milieu de culture dépourvu de SVF pendant 2 heures à 37°C. Lors de la détermination de l'activité de transport sodium-dépendant du phosphate, les cellules ont alors été incubées pendant 6 minutes à température ambiante dans un milieu "T" composé de 137 mmol/l de NaCl, 5.4 mmol/l de KCl, 2.8 mmol/l de CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mmol/l de MgSO<sub>4</sub>, 10 mmol/l de Tris HCl/HEPES (pH 7.4) et 0.1 mmol/l de KH<sub>2</sub><sup>32</sup>PO<sub>4</sub> (Amersham Pharmacia Biotech) dont l'activité spécifique est de 7.4 GBq/mmol. Une fois le temps d'incubation terminé, les cellules ont été lavées par 5 fois avec 2 ml d'une solution "S" composée de 137 mmol/l de NaCl et 10 mmol/l de Tris HCl (pH 7.2), solubilisées par le Triton X-100 à une concentration de 0.5%, et la radioactivité émise par le phosphore 32 a été déterminée par scintillation liquide. Pour chaque échantillon, nous avons déterminé la concentration en protéines totales par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Les taux de transport ont ainsi été quantifiés

en terme de picomoles (pmoles) de phosphate absorbé par mg de protéines totales. Dans le cadre de la détermination du taux de transport de phosphate dont le processus cellulaire est indépendant du gradient électrochimique en sodium, celui-ci a été effectué de manière similaire à ce qui vient d'être décrit, si ce n'est que le sodium a été substitué par le *N*-méthyl-*D*-glucamine (MGA : Sigma<sup>®</sup>) dans la solution "T".

### **V.3/ Mesure du taux de transport de l'uranium.**

Pour ce type d'étude, les cellules ont été mises en culture dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre (Merck Eurolab<sup>®</sup>), et le taux de transport de l'uranium a été mesuré par l'intermédiaire de l'uranium 233 (CERCA), introduit dans le milieu d'incubation sous la forme de nitrate d'uranyle, et que nous avons utilisé comme traceur radioactif. Après 2 lavages avec 2 ml de tampon Ringer (pH 7.2), les cellules ont été incubées pendant 2 heures à 37°C dans 3 ml de milieu nutritionnel dépourvu de SVF. Les cellules ont ensuite été mises en contact avec différentes concentrations en uranium 233, dilué dans le milieu nutritionnel classique, et cela pour des temps d'incubation variables. Les cellules ont alors été lavées à 6 reprises avec 2 ml de tampon Ringer froid (0°C) préalablement additionné 5g/l d'Ethane-1-Hydroxy-1,1-Biphosphonate (EHBP). Nous avons utilisé l'EHBP au cours de cette étape de lavage du fait de ses propriétés de chélation de l'uranium (Ubios *et al*, 1994 ; Hengé-Napoli *et al*, 1999 ; Martinez *et al*, 2000) dans le but de supprimer la liaison non-spécifique de l'actinide à la membrane plasmique des cellules. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 3 heures avec 2 ml d'une solution de lyse (MOPS pH 7.4, Triton X-100 à 0.1%), puis nous avons déterminé pour chaque échantillon la concentration en protéine totale par la méthode de Bradford et l'émission  $\alpha$  associée par scintillation liquide. Les résultats ont ainsi été exprimés en pmoles d'uranium par mg de protéine totale.

## **VI/ Etude de la spéciation de l'uranium.**

La spéciation désigne la détermination et la caractérisation des espèces chimiques présentes en solution. L'étude de la spéciation repose sur la réalisation de codes de calcul à partir des caractéristiques thermodynamiques de complexation des éléments en solution entre eux, et permet ainsi l'établissement de modèles

théoriques de répartition des espèces chimiques : les diagrammes de spéciation. Ces modèles théoriques sont élaborés en fonction de paramètres tels que le pH et la température de la solution, ou encore en fonction de la concentration d'un électrolyte donné. Il existe à ce jour de nombreux logiciels bio-informatiques permettant la réalisation de tels diagrammes de spéciation. Parmi ceux-ci, nous avons choisi le logiciel CHESS (Ecole des mines de Paris), qui regroupe dans sa base de données l'ensemble des constantes de complexation connues pour l'uranium.

## **VII/ Révélation de rNaPi-2 par Western Blot.**

Ce travail, qui a été réalisé à partir des cellules MDCK transfectées, a été effectué dans le but de valider le modèle d'étude. Il s'agissait plus précisément de vérifier que le pré-traitement de ces cellules pendant 16 heures avec 1  $\mu\text{mol/l}$  de dexaméthasone engendrait effectivement une activation du promoteur du gène codant pour le co-transporteur rNaPi-2, et que cette dernière était associée à une stimulation de l'activité de transport sodium-dépendant du phosphate.

### **VII.1/ Préparation des membranes.**

Une fois la confluence cellulaire atteinte, les cellules ont été lavées par deux fois avec 3 ml d'une solution Ringer (122.5 mmol/l de NaCl, 5.4 mmol/l de KCl, 1.2 mmol/l de  $\text{CaCl}_2$ , 0.8 mmol/l de  $\text{MgCl}_2$ , 5.5 mmol/l de glucose, 10 mmol/l d'HEPES, 0.8 mmol/l de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  et 0.2 mmol/l de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.4). La moitié des cellules a alors été incubée pendant 16 heures dans un milieu de culture nutritionnel classique contenant 1  $\mu\text{mol/l}$  de dexaméthasone, préalablement préparé à une concentration de 1 mmol/l dans l'éthanol 70%. L'autre moitié des cellules a été incubée en présence d'un volume identique en éthanol 70%. Les cellules ont ensuite été placées à 0°C dans de la glace en fusion, lavées à deux reprises avec 5 ml de tampon TBS froid (Tris Buffer Saline : 0.9% NaCl et 10 mmol/l de Tris-HCl, pH 7.4), séparées mécaniquement par l'intermédiaire d'un *cell scrapper*, puis diluées dans 15 ml d'une tampon de reprise (5 mmol/l d'HEPES-Tris, 4 mmol/l d'EDTA, 5 mg/l de leupeptine et 1 mmol/l de phénylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), pH 7.4). Les cellules ont alors été homogénéisées à la seringue de 10 ml munie d'une aiguille de 2 mm de diamètre, et la suspension a été centrifugée à 50 000g pendant 30 minutes à 4°C (Beckman LE-80 ultracentrifuge, rotor SW41 TI). Une fois la centrifugation terminée,

le surnageant a été éliminé et le culot repris dans 300 µl d'un nouveau tampon de reprise composé de 10 mmol/l d'HEPES-Tris/HCl (pH 7.2), 5 mg/l de leupeptine, 1 mmol/l de PMSF et 50 mmol/l de mannitol.

### **VII.2/ Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-Page)**

Le jour de l'étude, les extraits membranaires ont été repris dans un tampon Laemli 4X (Tris HCl pH 6.8 à 0.2 mol/l, SDS 8%, β-mercaptoéthanol 20%, glycérol 40% et bleu de bromophénol 0.1%), portés à ébullition pendant 10 minutes, puis 40 µg de protéines ont été déposés sur un gel de polyacrylamide 10% préparé extemporanément en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS) 0.1%. Ce dernier est en réalité constitué de 2 parties. La partie supérieure est appelée "gel de concentration", qui comme son nom l'indique sert à concentrer les protéines. Il s'agit d'un gel dont la concentration en polyacrylamide est de 4%. La partie inférieure, appelée "gel de séparation", est composée d'une concentration en polyacrylamide de 10% et sert à séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire. Une fois déposées sur le gel, les protéines ont été séparées par migration électrophorétique réalisée à 100V pendant 30 minutes puis 200V pendant 1 heure.

### **VII.3/ Révélation de rNaPi-2 par Western Blot**

Les protéines ont ensuite été transférées sur membrane de nitrocellulose selon la technique de Towbin (1992). Ce transfert a été effectué dans un tampon de transfert (Tris 50 mmol/l, glycine 40 mmol/l, SDS 0.0375% et méthanol 20% afin d'améliorer l'adsorption des protéines sur la membrane de nitrocellulose) pendant 1 heure à 4°C avec un ampérage de 1mA/cm<sup>2</sup>. Les membranes de nitrocellulose ont alors été incubées pendant 2 heures à température ambiante dans un tampon TBS dans lequel nous avons additionné 10% de lait écrémé (tampon Blotto) dans le but de bloquer les sites non-spécifiques de liaison et 1% de Triton X-100 (tampon Blotto-TX-100). Les immunoblots ont ensuite été incubés pendant 24 heures à 4°C avec l'anticorps polyclonal primaire de lapin (dilué au 1:2000 dans le tampon blotto) dirigé contre la partie C-terminale du co-transporteur rNaPi-2 de type IIa. Après trois lavages des immunoblots avec 20 ml de tampon TBS complété avec 10% de tampon Blotto-TX-100, ces derniers ont alors été incubés pendant 1 heure à température ambiante avec 20 ml de tampon Blotto-TX-100. A la suite de cette période

d'incubation, les membranes de nitrocellulose ont été mises en contact pendant 2 heures à température ambiante avec un anticorps secondaire anti-lapin couplé à la peroxydase (POD), et dilué au 1:10.000 dans du tampon Blotto-TX-100. Les immunoblots ont ensuite été lavés à trois reprises pendant 5 minutes avec 20 ml de tampon TBS complété avec du Triton X-100 à 0.1%, puis trois autres fois 5 minutes avec 20 ml de tampon TBS. Finalement, la révélation antigénique a été réalisée en présence de luminol sur une période de 30 à 60 secondes. L'oxydation du luminol qui en résulte émet de la lumière, et c'est ce signal de chimioluminescence qui a été détecté par autoradiographie sur films X-OMAT AR (Kodak).

## **VIII/ Caractérisation de l'apoptose par la méthode de l'échelle d'ADN.**

### **VIII.1/ Principe du test**

Lorsqu'il y a induction d'apoptose, cette dernière se caractérise au niveau biochimique par l'activation d'une cascade enzymatique intracellulaire dont le déterminant moléculaire central est la caspase 3. Celle-ci est alors à l'origine de l'activation d'une endonucléase calcium et magnésium-dépendante, la caspase-activated DNase (CAD), qui existe à l'état naturel sous une forme inactive (Nagata, 2000). L'activation de cette dernière provoque alors la coupure de l'ADN entre deux nucléosomes et fragmente ainsi l'ADN. Ces fragments de 180 paires de bases (Wyllie, 1980) sont ainsi des marqueurs de l'apoptose et peuvent être caractérisés par électrophorèse.

### **VIII.2/ Méthodologie**

Suite au traitement par le *cis*-platine (contrôle positif pour l'obtention de l'apoptose) ou par l'uranium à différents temps d'incubation (16 et 24 heures), les cellules ont été lavées à deux reprises avec 2 ml de tampon TBS froid (4° C) puis diluées dans 200 µl de tampon de lyse (Tris HCl 5 mmol/l pH 7.5, EDTA 20 mmol/l et Triton X-100 à 0.5%). Les cellules contenues dans les solutions de lavage ont alors été centrifugées pendant 1 min à 5000 rpm. Le culot a été repris dans 20 à 30 µl de tampon de lyse, homogénéisé à la pipette, puis additionné au lysat cellulaire précédemment obtenu. L'ensemble a alors été homogénéisé à la seringue 2 ml, placé pendant 30 min dans la glace et enfin centrifugé 30 min à 12 000 rpm. Les

protéines contenues dans le surnageant ont ensuite été digérées en présence de protéinase K à une concentration de 0.3 mg/ml pendant 1 heure à 60°C, puis toute la nuit dans un bain-marie placé à 37°C. Le lendemain, l'ADN a été extrait de l'homogénat à l'aide d'un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (PCI 25:24:1) et précipité dans une solution composée de 0.1 volume de sodium acétate 3 mol/l et de 2.5 volumes d'éthanol absolu. Le culot qui a pu être obtenu après centrifugation de l'homogénat à 12 000 rpm pendant 30 min a été lavé à l'éthanol 70%, séché puis enfin re-dissout dans 10 à 20 µl de tampon ADN (Tris HCl 10 mmol/l pH 8, NaCl 50 mmol/l, EDTA 1 mmol/l) supplémenté avec une concentration finale de 200 µg/ml de RNase A pendant 1 heure à 37°C. L'ADN a ensuite été dosé par spectrométrie à 260 et 280 nm, puis une quantité identique d'ADN par échantillon a été déposée sur un gel d'électrophorèse horizontal d'agarose préalablement préparé et composé de 1.7% d'agarose solubilisé dans un tampon TBE (Tris 90 mM, acide Borique 90 mM, EDTA 20 mM pH 8). La migration de l'ADN a été effectuée à 60 V, puis le gel a été visualisé sur une table U.V après coloration par le bromure d'éthidium.

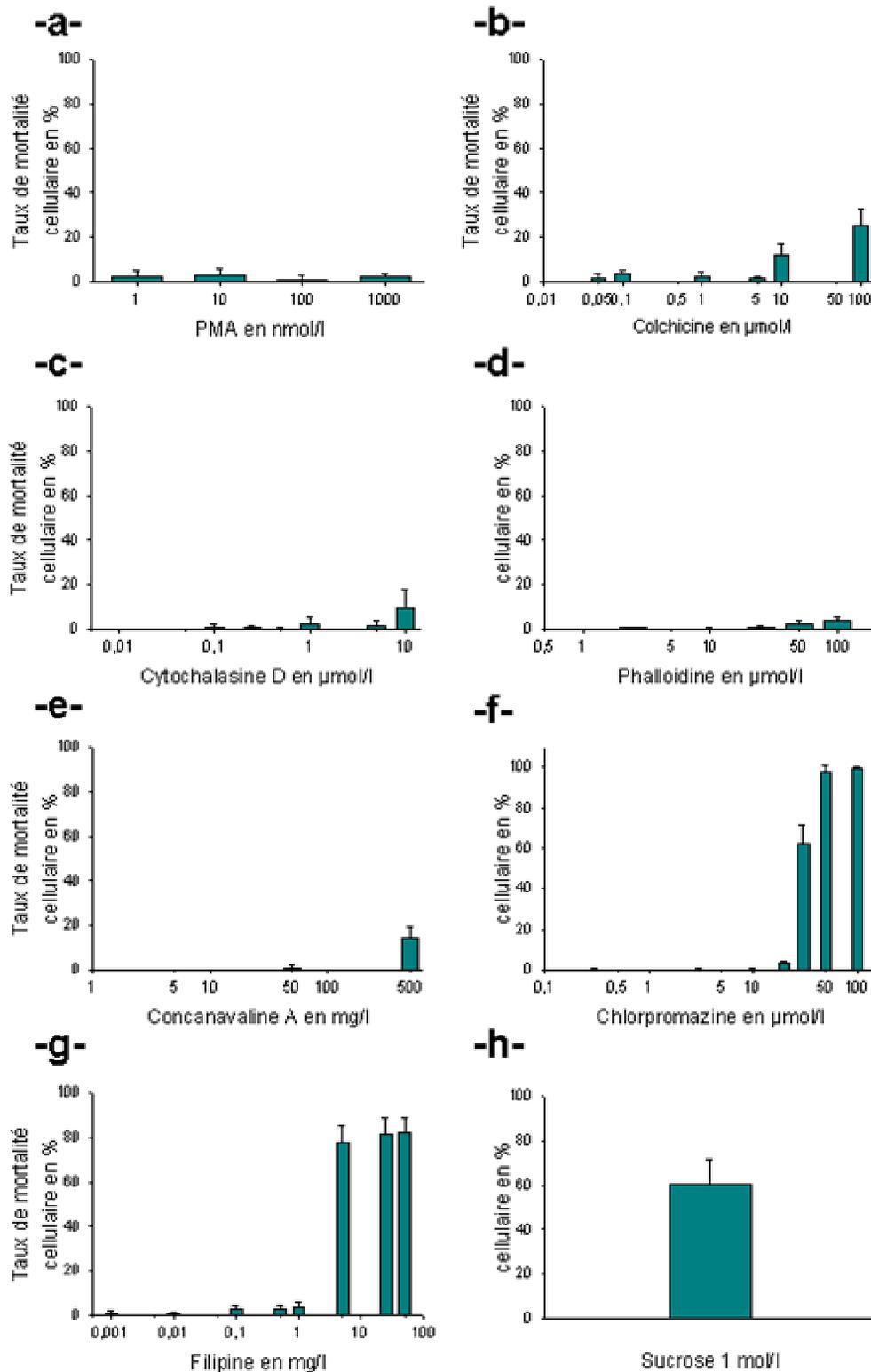
## **IX/ Etude de l'effet d'agents biochimiques sur le transport de l'albumine-fitc, du phosphate, de l'absorption et de la cytotoxicité de l'uranium.**

Comme cela sera décrit plus en détail dans la troisième partie de ce manuscrit, nous avons choisi de tester lors de notre travail l'effet du phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA), de la colchicine, de la cytochalasine D, de la phalloïdine, de la concanavaline A, du sucrose (condition expérimentale d'hyperosmolarité), de la chlorpromazine et de la filipine sur l'endocytose de l'albumine-fitc, le transport du phosphate et de l'uranium, et enfin sur la cytotoxicité induite par l'actinide. Puisque l'objectif était de comparer le rôle de l'endocytose clathrine-dépendante, puis celui du co-transport sodium-dépendant du phosphate vis-à-vis de l'absorption et de la toxicité de l'uranium, il était impératif de tester tout au long de notre étude les substances aux mêmes concentrations, avec des doses non toxiques pour les cellules. Pour cela, nous avons donc évalué le degré de toxicité de chaque molécule à 24 heures par le test de cytotoxicité, que nous avons précédemment décrit au cours du paragraphe IV de cette même partie du manuscrit. Les cellules LLC-PK<sub>1</sub> ont

ainsi été incubées pendant 24 heures, soit en présence d'une gamme de concentrations croissantes en PMA, colchicine, cytochalasine D, phalloïdine, concanavaline A, chlorpromazine et filipine, soit en présence d'une concentration en sucrose de 1 mol/l afin de se placer dans une condition expérimentale d'hyperosmolarité. A la suite de cette période d'incubation, le taux de LDH dans le milieu extracellulaire a alors été quantifié, et cela nous a permis d'établir le profil de toxicité de ces éléments (**figure 24**). Ce dernier nous a alors servi de référence dans le but de sélectionner pour chacun d'entre eux une concentration non toxique que nous avons ensuite utilisée au cours de nos travaux. Le choix de ces concentrations est répertorié dans le **tableau VII**. Ainsi, l'incubation des cellules en milieu hyperosmolaire étant une condition expérimentale toxique à 24 heures pour les cellules, cette condition ne sera donc pas testée dans le cadre des études de cytotoxicité de l'uranium, mais uniquement restreinte aux études de transport qui sont effectuées à plus court terme.

## **X/ Statistiques**

La degré de signification des différences entre les valeurs moyennes des données que nous avons inter-comparées a été calculé par une analyse de variance à un facteur suivie d'un test-*t* de *student*. Les différences ont été déclarées significatives pour  $p < 0.01$ .



**Figure 24 : Etablissement des profils de toxicité des substances connues pour altérer l'endocytose clathrine-dépendante.**

Les cellules LLC-PK<sub>1</sub> ont été incubées pendant 24 heures soit en présence de gammes de concentrations croissantes en phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA : a), colchicine, (b) cytochalasine D (c), phalloidine (d), concanavaline A (e), chlorpromazine (f) et filipine (g), soit dans un milieu de culture composé de sucrose à une concentration finale de 1 mol/l (h). Le taux de cytotoxicité a ensuite été déterminé par la mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH)

<i>Substance testée</i>	<i>Concentration maximale non toxique à 24 heures</i>	<i>Concentration Choisie</i>
PMA	>1000 nmol/l	10 nmol/l
Colchicine	<5-10 µmol/l>	1 µmol/l
Cytochalasine D	<5-10 µmol/l>	0.5 µmol/l
Phalloidine	>100 µmol/l	25 µmol/l
Concanavaline A	<50-100 mg/l>	10 mg/l
Chlorpromazine	<25-30 µmol/l>	10 µmol/l
Filipine	<1-5 mg/l>	0.5 mg/l
Sucrose 1 mol/l	<b>Toxique</b>	1 mol/l

**Tableau VII** :Tableau récapitulatif des concentrations non toxiques et des concentrations qui ont été sélectionnées pour notre étude.

# RÔLE DE L'ENDOCYTOSE DANS L'ASSIMILATION ET LA TOXICITE DE L'URANIUM

## I/ Objectifs de l'étude

L'endocytose est un mécanisme cellulaire ubiquitaire et une propriété des cellules eucaryotes par lequel sont absorbées certaines particules exogènes. Ces dernières peuvent être de nature protéique, métallique ou encore des bactéries et des virus. A ce jour, plusieurs types d'endocytose ont été décrits dans la littérature et diffèrent les uns des autres au niveau biochimique et moléculaire (Lamaze et Schmid, 1995). Parmi ces différents mécanismes, les endocytoses clathrine- et cavéoline-dépendantes sont les processus les plus étudiés, et certainement les plus importants si l'on considère leur fonction cellulaire. Cependant, tandis que le premier type d'endocytose est un mécanisme cellulaire constitutif, qui régule l'internalisation de nombreux composants membranaires, le second type est non-constitutif (Thomsen *et al*, 2002) et semble être préférentiellement impliqué dans la régulation de la transduction du signal et le contrôle de l'homéostasie cellulaire du cholestérol (Razani et Lisanti, 2001 ; Anderson, 1998). Au niveau rénal, l'une des fonctions de l'endocytose est la réabsorption tubulaire proximale des protéines filtrées par le glomérule (Wall et Maack, 1985 ; Christensen et Nielsen, 1991). L'endocytose par récepteur interposé, un processus clathrine-dépendant qui fait intervenir la notion d'interaction entre un ligand et un récepteur membranaire, joue un rôle crucial dans ce mécanisme. Ce type d'endocytose est en effet à l'origine de la réabsorption d'une grande variété de protéines, telle que l'albumine, et est accompli par l'intermédiaire de récepteurs-clés tels que la mégaline et la cubiline (Verroust et Kozyraki, 2001 ; Christensen et Birn, 2001, 2002).

Comme nous l'avons précédemment décrit dans la première partie de ce manuscrit, les reins, et plus précisément les tubules proximaux des néphrons, sont les organes préférentiels de dépôt et de toxicité de l'uranium. A ce sujet, bien qu'il n'existe à l'heure actuelle aucune étude expérimentale visant à déterminer le(s) mécanisme(s) de réabsorption tubulaire proximale de l'uranium, les nombreuses approches histopathologiques ont cependant permis de mettre en évidence

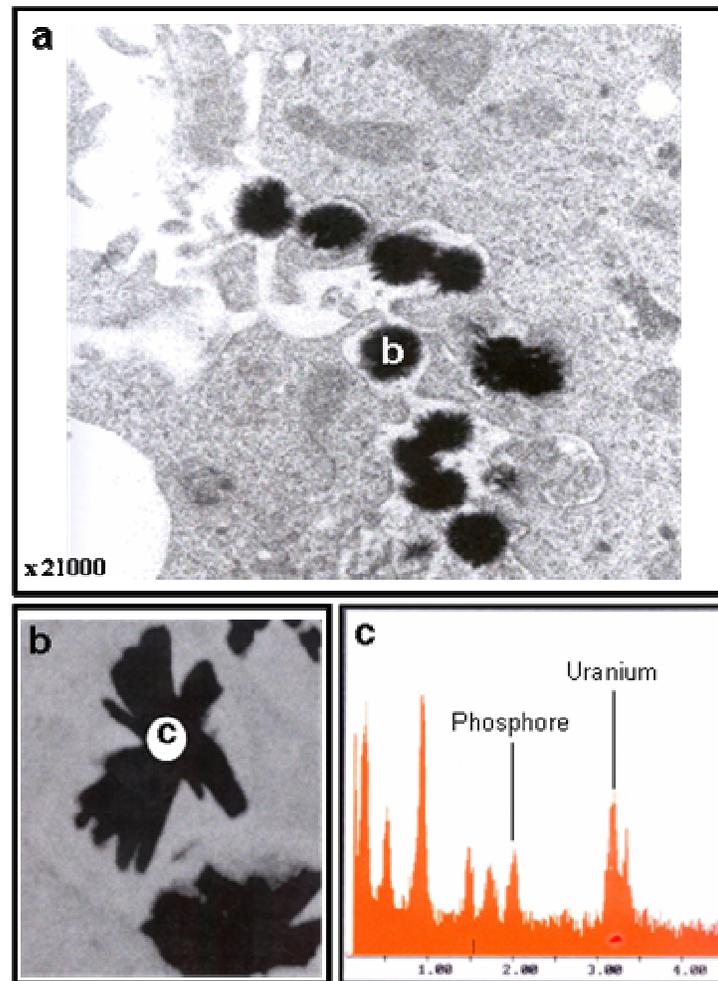
l'accumulation de cet élément au sein de structures cellulaires spécifiques : les lysosomes. L'uranium s'y accumule en effet sous la forme d'un micro-précipité de phosphate d'uranyle, dense aux électrons, et peut donc être observé par microscopie électronique à transmission (**figure 25**). Or, puisque l'une des fonctions physiologiques des lysosomes est soit la dégradation, soit le stockage puis l'élimination par exocytose des particules exogènes endocytées (**figure 26**), il est suggéré que le mode de réabsorption tubulaire proximal de l'uranium est un processus endocytique. **Au cours de la première partie de cette thèse, nous avons par conséquent cherché à déterminer si l'endocytose correspond au mécanisme cellulaire responsable du transport de l'uranium des fluides extracellulaires vers la cellule, et si ce processus est à l'origine de la toxicité de cet élément.**

Pour cela, nous avons choisi d'évaluer l'effet d'agents pharmacologiques, connus pour interférer avec le processus endocytique clathrine-dépendant, sur l'accumulation et la toxicité du métal. Le mécanisme de réabsorption de l'albumine étant l'un des processus endocytiques rénaux les plus étudiés, nous avons sélectionné un dérivé fluorescent de cette protéine, l'albumine-fitc, en tant que marqueur d'endocytose clathrine-dépendante. Toutefois, bien que le mécanisme endocytique par lequel l'albumine est réabsorbée par les cellules tubulaires proximales ait été largement étudié *in vitro* par l'intermédiaire du modèle cellulaire OK, ce processus a très peu été étudié dans le système LLC-PK<sub>1</sub>. Ainsi, la première partie de notre travail a consisté à déterminer dans ce modèle cellulaire les paramètres cinétiques de transport de l'albumine-fitc et celles de l'uranium. La seconde partie a alors consisté à caractériser l'effet pharmacologique de différentes substances sur l'endocytose clathrine-dépendante dans le modèle LLC-PK<sub>1</sub>, puis sur le transport, l'accumulation et la toxicité cellulaire de l'actinide.

## **II/ Détermination des paramètres cinétiques**

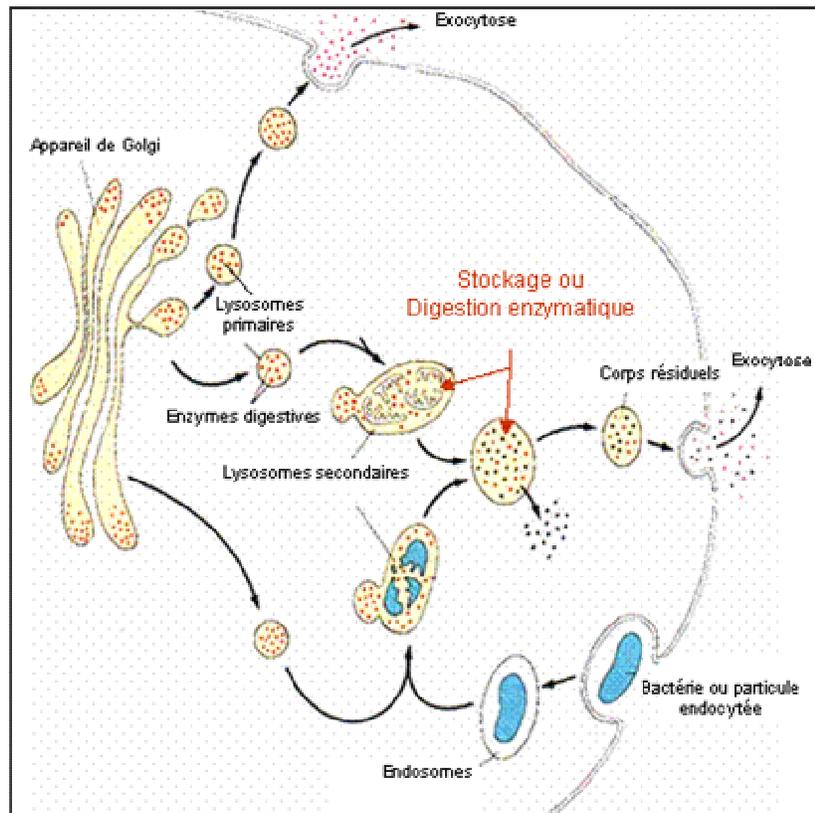
### **II.1/ Caractérisation de l'endocytose de l'albumine-fitc**

Lorsque l'on veut caractériser l'effet pharmacologique de substances physiologiquement actives sur un mécanisme de type enzymatique ou sur des systèmes de transport membranaire, il est capital que les études soient effectuées



**Figure 25** : Clichés de microscopie électronique à transmission et analyse de la composition des inclusions par diffraction aux rayons X.

(a) Micrographie d'une cellule tubulaire proximale après intoxication par l'uranium. On observe la présence d'inclusions intra-lysosomale. La structure de ces inclusions se présente sous la forme d'un cristal en croissance (b) dont la composition, déterminée par diffraction aux rayons X (c), met en évidence la présence de phosphore et d'uranium.

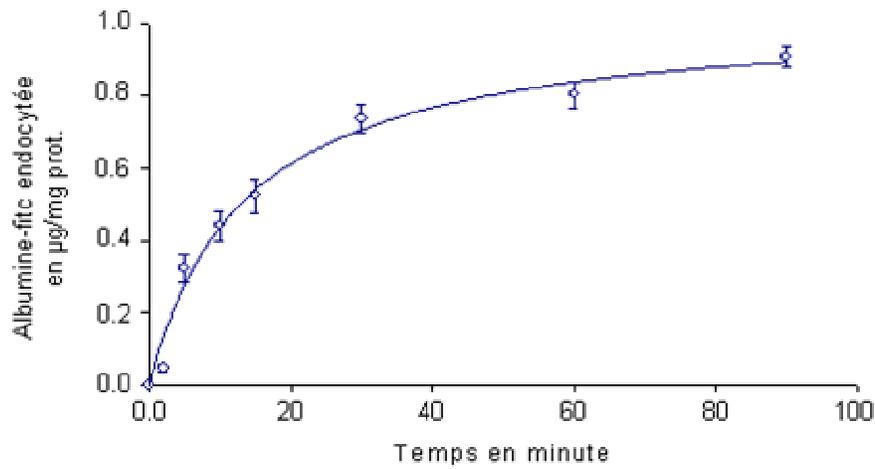


**Figure 26** : Fonction lysosomale de stockage et de dégradation des particules endocytées.

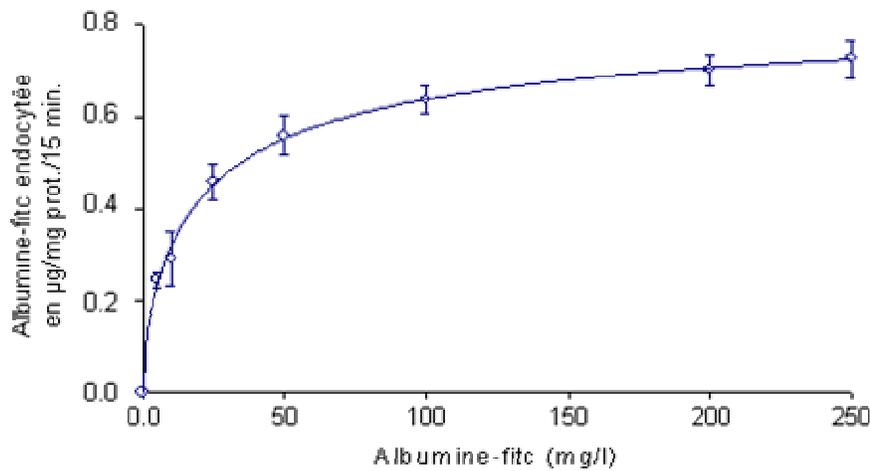
lors de la phase linéaire de la réaction. Nous avons par conséquent déterminé en première instance l'échelle de temps correspondant à la phase initiale de l'endocytose de l'albumine-fitc. Les cellules LLC-PK<sub>1</sub> ont ainsi été incubées avec une concentration en albumine-fitc de 100 mg/l sur une échelle de temps s'étendant de 5 à 90 minutes (**figure 27a**), puis la fraction d'albumine intracellulaire a été évaluée par spectrophotométrie de fluorescence. Dans cette série d'expériences, ainsi que dans l'ensemble des travaux menés sur l'étude de l'endocytose qui seront présentés ultérieurement, l'absorption spécifique de l'albumine-fitc a été déterminée par la soustraction de la fraction liée à la membrane, déterminée en présence d'un excès d'albumine non marquée, de la quantité totale qui a été mesurée (voir partie « matériel et méthode »). Il en ressort que la quantité d'albumine-fitc endocytée croît linéairement durant les 20 premières minutes d'incubation avant de tendre progressivement vers un équilibre d'absorption au delà de la 30<sup>ème</sup> minute (**figure 27a**). Ainsi, l'ensemble des études expérimentales concernant l'endocytose qui ont été réalisées, et qui seront présentées dans la suite du document, ont été effectuées pour un temps d'incubation de 15 minutes, une période au cours de laquelle le processus endocytique est toujours dans sa phase linéaire d'activité.

D'un autre côté, le transport d'une molécule ou d'un ion par l'intermédiaire d'un récepteur ou d'un transporteur peut être assimilé à l'activité enzymatique et peut donc être caractérisé par deux paramètres : l'un correspondant au nombre maximal de sites disponibles pour le substrat ( $V_{max}$ ), et le second correspondant à la concentration en substrat permettant l'obtention de la demi-saturation du système. Ce dernier est également défini sous le terme de constante d'affinité apparente du récepteur pour son substrat ( $K_d$ ). D'après nos résultats, l'endocytose de l'albumine-fitc est un processus saturable (**figure 27b**) qui est accompli *via* un seul type de récepteur comme cela peut être déterminé par la méthode d'Eadie-Hofstee (**figure 27c**). La demi-saturation du système ( $K_d$ ) est ainsi obtenue pour une concentration de  $28 \pm 6$  mg/l d'albumine-fitc, et la réabsorption maximale ( $V_{max}$ ) est estimée à  $0.789 \pm 0.13$  mg/g de protéines totales. Ces résultats sont en accord avec l'ensemble des données qui ont été décrites précédemment pour le modèle cellulaire OK (Scwegler *et al*, 1991) et à partir de tubules proximaux de reins de lapin perfusés (Park et Maack, 1984), où la constante d'affinité apparente pour l'albumine a été évaluée respectivement à 24 et 31 mg/l. Enfin, le coefficient de Hill, qui permet de

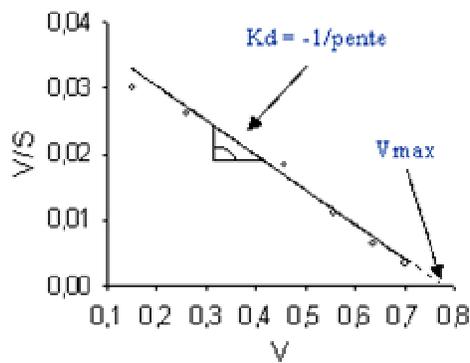
**-a-**



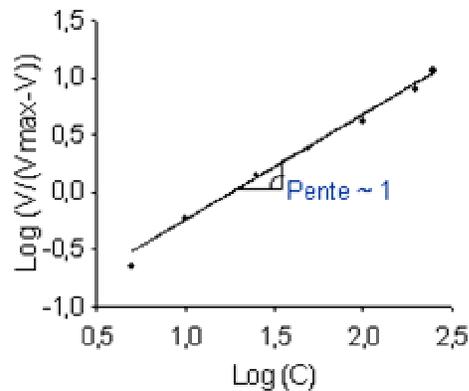
**-b-**



**-c-**



**-d-**



**Figure 27 . Caractéristiques fonctionnelles de l'endocytose de l'albumine-fitc dans la lignée cellulaire LLC-PK<sub>1</sub>.**

**(-a-)** Paramètre cinétique de l'endocytose de l'albumine-fitc, déterminé avec une concentration de 100 mg/l. **(-b-)** Quantité d'albumine-fitc endocytée en fonction de sa concentration. **(-c-)** Détermination de la concentration saturante ( $V_{max}$ ) et de la concentration permettant d'obtenir la demi-saturation ( $K_d$ ) à partir des résultats obtenus en -b-. **(-d-)** Détermination du coefficient de Hill.

déterminer la stœchiométrie du système, n'est pas très significativement différent de 1 (**figure 27d**). Il s'agit par conséquent d'un processus de transport de type Michaelien qui peut être caractérisé mathématiquement par la formule :

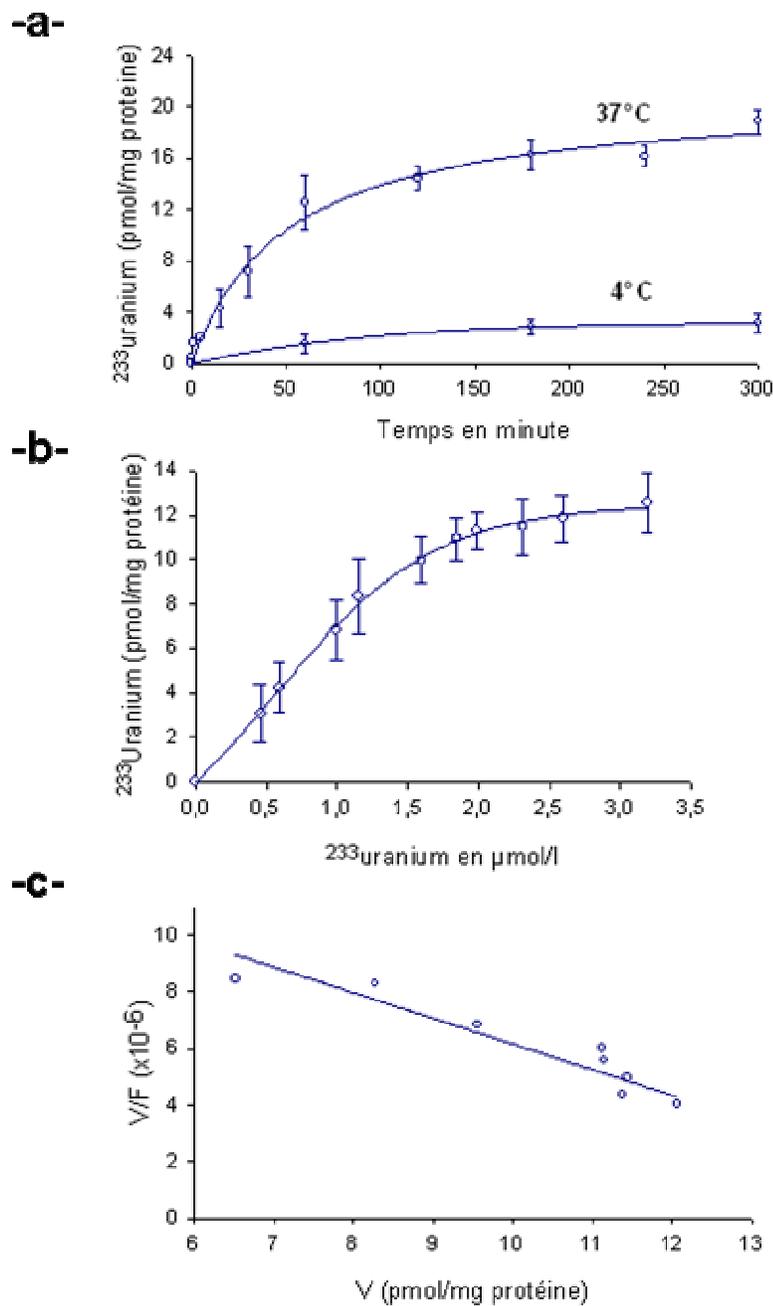
$$V = \frac{V_{\max} \cdot [\text{albumine}]}{K_m + [\text{albumine}]}$$

En résumé, l'albumine-fitc est endocytée par les cellules LLC-PK<sub>1</sub> aux concentrations utilisées par l'intermédiaire d'un unique système de transport, saturable et d'affinité apparente de  $28 \pm 6$  mg/l. La lignée LLC-PK<sub>1</sub> est par conséquent un modèle cellulaire adéquat pour l'étude de l'endocytose de l'albumine.

## II.2/ Caractérisation de l'absorption de l'uranium

Puisque l'uranium est également un élément absorbé par les cellules tubulaires proximales, il est donc logique de penser que ce dernier emprunte un (ou plusieurs) système(s) de transports, qui comme dans le cas de l'albumine, peut (peuvent) être caractérisé(s) par les paramètres cinétiques K<sub>d</sub> et V<sub>max</sub>. Ainsi, dans le but de déterminer une éventuelle affinité apparente et un nombre de sites maximal de liaison à la membrane, nous avons réalisé le même type d'étude que celle qui a été décrite dans le paragraphe III.1 sur la cinétique d'absorption de l'uranium.

Dans un premier temps, les cellules LLC-PK<sub>1</sub> ont été incubées à 37°C avec une concentration de 2 µmol/l en uranium 233 sur une période s'étalant de 0 à 300 minutes. Comme cela est illustré dans la **figure 28a**, l'accumulation de l'uranium suit une cinétique de type logarithmique, augmentant tout d'abord linéairement pendant les 60 premières minutes, puis semblant atteindre progressivement un plateau d'équilibre au-delà de la 120<sup>ème</sup> minute d'incubation. Or, puisque l'absorption d'uranium 233 par les cellules est fortement inhibée lorsque l'expérience est conduite à 4°C, le transport trans-membranaire de l'actinide est à priori un mécanisme actif. A partir de ces résultats, nous avons donc choisi un temps d'incubation de 60 minutes



**Figure 28 : Paramètres cinétiques de l'absorption de l'uranium par les cellules LLC-PK<sub>1</sub>.**

**(-a-)** Détermination de la phase linéaire de l'absorption de l'uranium. Dans cette série d'expériences, les cellules LLC-PK<sub>1</sub> ont été incubées avec 2 µmol/l d'uranium <sup>233</sup> sur une échelle de temps allant jusqu'à 300 minutes. **(-b-)** Absorption de l'uranium en fonction de sa concentration dans le milieu d'incubation. **(-c-)** Détermination de la concentration des paramètres cinétiques V<sub>max</sub> et K<sub>d</sub> à partir des résultats obtenus en -b- par la méthode de Eadie-Hofstee.

pour caractériser le(s) mécanisme(s) cellulaire(s) responsable(s) du transport de l'uranium. L'incubation des cellules avec une gamme de concentration croissante en uranium 233, s'échelonnant entre 0.45 et 3.2  $\mu\text{mol/l}$ , a alors permis de mettre en évidence, qu'aux concentrations utilisées, l'actinide est absorbé par les cellules *via* un système de transport saturable (**figure 28b**). La détermination de la constante d'affinité apparente et du nombre maximal de sites de liaison par la méthode d'Eadie-Hofstee (**figure 28c**) donnent des valeurs de  $K_d$  et de  $V_{\text{max}}$  respectivement de  $1.105 \pm 0.175 \mu\text{mol/l}$  et  $16.95 \pm 0.92 \text{ pmoles par mg de protéines totales}$ .

### **III/ Rôle de l'endocytose clathrine-dépendante vis-à-vis de l'absorption et de la cytotoxicité de l'uranium**

#### **III.1/ Choix des conditions expérimentales et des agents pharmacologiques**

Comme nous l'avons déjà décrit précédemment, l'endocytose clathrine-dépendante est un processus de transport régulé à différents niveaux par une grande diversité de protéines adaptatrices et de facteurs de régulation. Il existe ainsi un grand nombre d'agents pharmacologiques, et plusieurs conditions expérimentales, connues pour altérer la fonction endocytique *via* les puits tapissés de clathrine. Parmi ceux-ci, nous avons choisi d'étudier les effets de la température, de l'hyperosmolarité, de la chlorpromazine, de substances connues pour déstructurer le cytosquelette cellulaire, de la concanavaleine A et d'un activateur de PKC : le PMA. Le choix de ces différentes substances et conditions expérimentales pour notre étude est justifié dans la suite de ce paragraphe.

#### ***III.1.1/ La température et l'hyperosmolarité***

La diminution de la température d'incubation à 4°C est la méthode la plus efficace et la moins toxique pour inhiber de nombreux systèmes de transport membranaire actifs, dont l'endocytose fait partie. A faible température, les lipides membranaires sont en effet dans une conformation hautement ordonnée, de fluidité très limitée, qui empêche l'invagination de la membrane plasmique. Il a ainsi été démontré que la dégradation du matériel endocyté est inhibée pour une température de moins de 20°C, et que l'internalisation de l' $[^{125}\text{I}]$ albumine-mannose est totalement supprimée lorsque la température descend en dessous de 10°C (Tomoda *et al*,

1989). De manière similaire à l'effet de la température, l'hyperosmolarité (ou hypertonicité) est une autre façon d'inhiber l'endocytose clathrine-dépendante. Bien que le mécanisme cellulaire impliqué ne soit pas connu, il semblerait que l'hyperosmolarité bloque l'étape la formation de la charpente de clathrine. Lors de l'utilisation d'un milieu hypertonique, il peut en effet être observé l'apparition d'anomalies structurales du tapis de clathrine au niveau de la membrane due à une altération du processus de polymérisation de la protéine (Heuser *et al*, 1989 ; Lutz et Kumar, 1993).

### ***III.1.2/ Altération de la formation des vésicules d'endocytose***

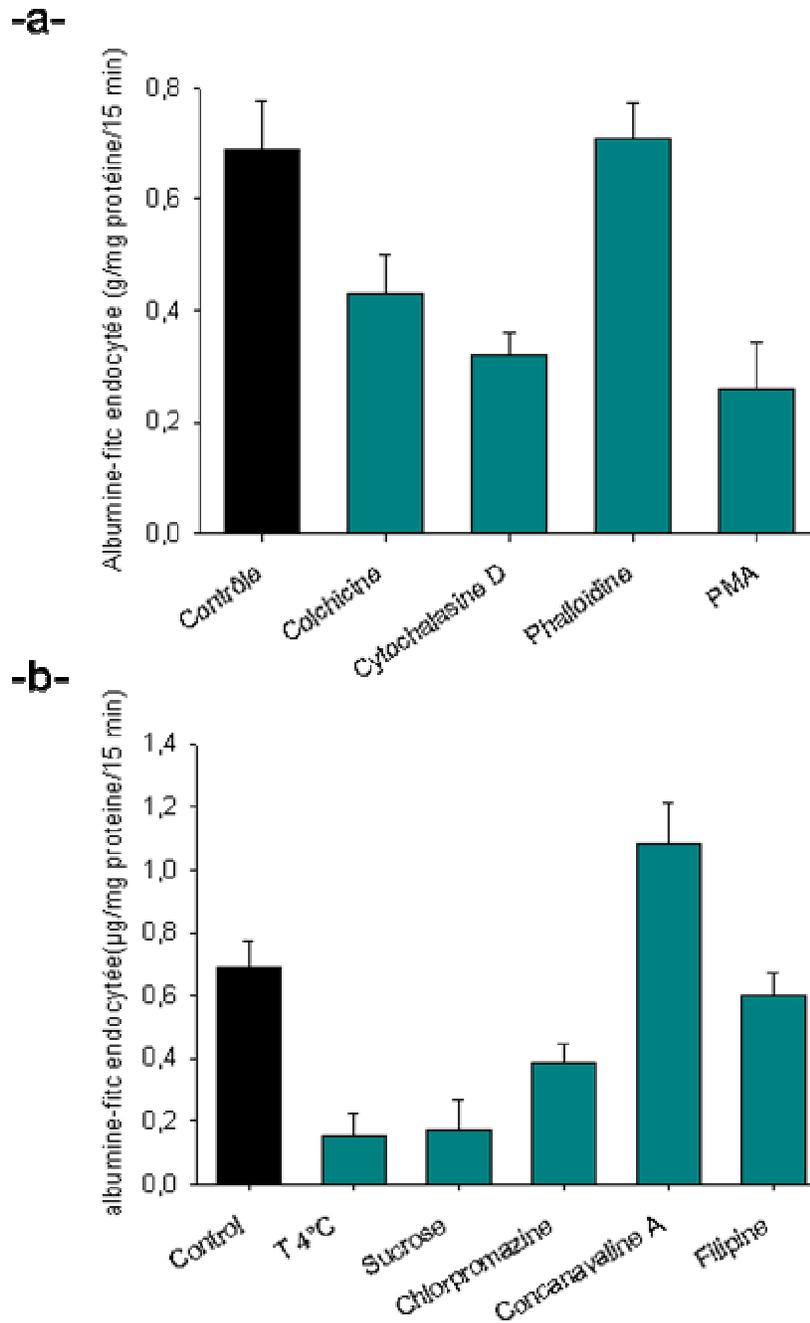
La chlorpromazine est une molécule cationique amphiphile qui inhibe l'endocytose en induisant une redistribution des protéines adaptatrices AP-2 dans le cytoplasme et ainsi un assemblage non-fonctionnel des unités de clathrine autour des vésicules endocytiques (Wang *et al*, 1993). La concanavaline A est une lectine qui se lie spécifiquement aux résidus mannose des glycoprotéines et glycolipides membranaires et module de la sorte leur mobilité latérale. Cet effet est néanmoins différent selon le type cellulaire étudié (Henis et Elson, 1981). Ainsi, en fonction du modèle cellulaire, la concanavaline A provoque soit une inhibition, soit une stimulation du processus endocytique. Ce phénomène a notamment été observé lors de l'étude du rôle de l'endocytose dans la régulation de l'activité membranaire du cotransporteur NaPi IIa. Dans cette étude, tandis que la concanavaline A engendrait une inhibition de l'endocytose en phase fluide (FPE) dans le modèle cellulaire LLC-PK<sub>1</sub>, elle provoquait en revanche une activation du processus dans le système OK (Kempson *et al*, 1989). Le PMA, un activateur de PKC, est également connu pour modifier le processus endocytique dans de nombreux types cellulaires. Cette modification est cependant différente selon le type de cellule et le mécanisme endocytique considéré. Par exemple, bien que l'activation de PKC par les récepteurs appartenant à la super famille des RCPGs soit connue pour être à l'origine de la stimulation de leur endocytose et par conséquent de leur rétro-régulation négative, d'autres études, telle que celle qui a été conduite à partir du système cellulaire OK, mettent en évidence un effet d'inhibition de l'endocytose de l'albumine (Gekle *et al*, 1997).

### **III.1.3/ Altération du cytosquelette d'actine et du réseau microtubulaire**

La cytochalasine D et la colchicine sont deux substances qui provoquent respectivement la dépolymérisation du cytosquelette d'actine et du réseau microtubulaire. A ce jour, bien que l'analyse génétique ne permette pas d'établir un lien direct entre le réseau cytosquelettique et l'endocytose chez les mammifères, il est cependant clairement établi que la dépolymérisation de l'actine filamenteuse induit un blocage de la RME au stade de l'invagination des puits tapissés de clathrine (Gottlieb *et al*, 1993, Lamaze *et al*, 1997). De manière similaire, il existe également un grand nombre de travaux qui supportent l'hypothèse d'un rôle fondamental du réseau microtubulaire dans les processus de transport vésiculaire (Aniento *et al*, 1993 ; Oda *et al*, 1995). Ainsi, dans une étude au cours de laquelle des rats ont été traités avec la colchicine (Elkjaer *et al*, 1995), des changements majeurs ont été observés au niveau de la membrane apicale des cellules de l'épithélium rénal par comparaison avec les rats non traités. Il a ainsi été observé une absence d'invaginations membranaires, une accumulation de larges vacuoles cytoplasmiques et une inhibition de la réabsorption de l'Horseradish peroxydase (HRP), un marqueur d'endocytose en phase fluide. Cependant, dans d'autres études, l'exposition de cellules en culture au nocodazole a soit significativement réduit l'endocytose de l'albumine (Gekle *et al*, 1997), soit eu aucun effet sur sa cinétique d'absorption.

### **III.2/ Altération pharmacologique de l'endocytose de l'albumine-fitc**

Ainsi, bien que l'altération de l'activité endocytique par la cytochalasine D ou encore par des conditions d'incubation telles que l'utilisation d'un milieu hyperosmolaire soit connue pour inhiber l'endocytose clathrine-dépendante, les effets des substances telles que la colchicine ou le PMA sont néanmoins spécifiques du type cellulaire étudié. Dans cette série d'expériences, nous avons donc cherché à caractériser les effets pharmacologiques de ces molécules sur l'endocytose de l'albumine-fitc dans le modèle cellulaire LLC-PK<sub>1</sub>. Ces cellules ont ainsi été traitées pendant 30 minutes avec les différentes substances, puis incubées pendant 15 minutes avec 50 mg/l d'albumine-fitc. Les concentrations des substances qui ont été testées sont données dans le chapitre « matériels et méthodes », et correspondent à des concentrations non-toxiques pour les cellules. Les **figures 29a et 29b** illustrent



**Figure 29 : Détermination de l'effet de certains agents pharmacologiques sur l'endocytose de l'albumine-fitc.**

L'effet de certaines substances et conditions expérimentales a été étudié sur l'endocytose de l'albumine-fitc (50 mg/l). Les cellules LLC-PK<sub>1</sub> ont été pré-traitées pendant 30 minutes, d'une part, avec des molécules connues pour interagir avec le cytosquelette cellulaire (colchicine, cytochalasine D et phalloïdine) et avec un activateur de PKC : le PMA (-a-). Ces cellules ont également été pré-traitées dans un milieu hyperosmolaire ou à 4°C, conditions expérimentales connues pour interférer avec l'endocytose, avec la chlorpromazine et la concanavalline A, qui modulent l'étape de la formation de la cage de clathrine, et enfin avec la filipine qui est un inhibiteur spécifique de l'endocytose cavéoline-dépendante (-b-).

la fraction d'albumine-fitc endocytée en fonction de l'agent pharmacologique ou de la condition expérimentale utilisés au cours de notre travail.

Il peut ainsi être observé que la colchicine, la cytochalasine D, le PMA, le sucrose (hyperosmolarité), la chlorpromazine et la diminution de la température engendrent une réduction significative de l'endocytose de l'albumine-fitc. Le pré-traitement des cellules avec le PMA induit une inhibition d'endocytose de 62.3%. De manière similaire, l'altération des réseaux cytosquelettiques d'actine et microtubulaire par la cytochalasine D et la colchicine provoquent également une réduction significative de l'endocytose de l'albumine-fitc : l'inhibition étant respectivement de 53.6 et 37.8%. Le processus endocytique *via* les puits tapissés de clathrine dans les cellules LLC-PK<sub>1</sub> est donc un mécanisme régulé par le taux d'activation de PKC et dépend de l'intégrité du cytosquelette cellulaire. Cette dernière caractéristique est notamment étayée par le résultat obtenu lors de la stabilisation du cytosquelette d'actine par la phalloïdine, laquelle n'a aucun effet sur l'internalisation de l'albumine. De manière logique, l'incubation des cellules à 4°C ou en présence de sucrose et de chlorpromazine, dont l'action résulte en une inhibition de la formation et du bourgeonnement des vésicules tapissées de clathrine, réduit également significativement l'activité l'endocytose de l'albumine-fitc. Les taux d'inhibition sont respectivement de 77.6, 74.9 et 43.7% pour la température, le sucrose et la chlorpromazine. En revanche, la concanavaline A, dont l'effet sur l'endocytose dépend étroitement du type cellulaire et du mode endocytique étudié, provoque ici une stimulation de l'absorption de l'albumine par les cellules LLC-PK<sub>1</sub>.

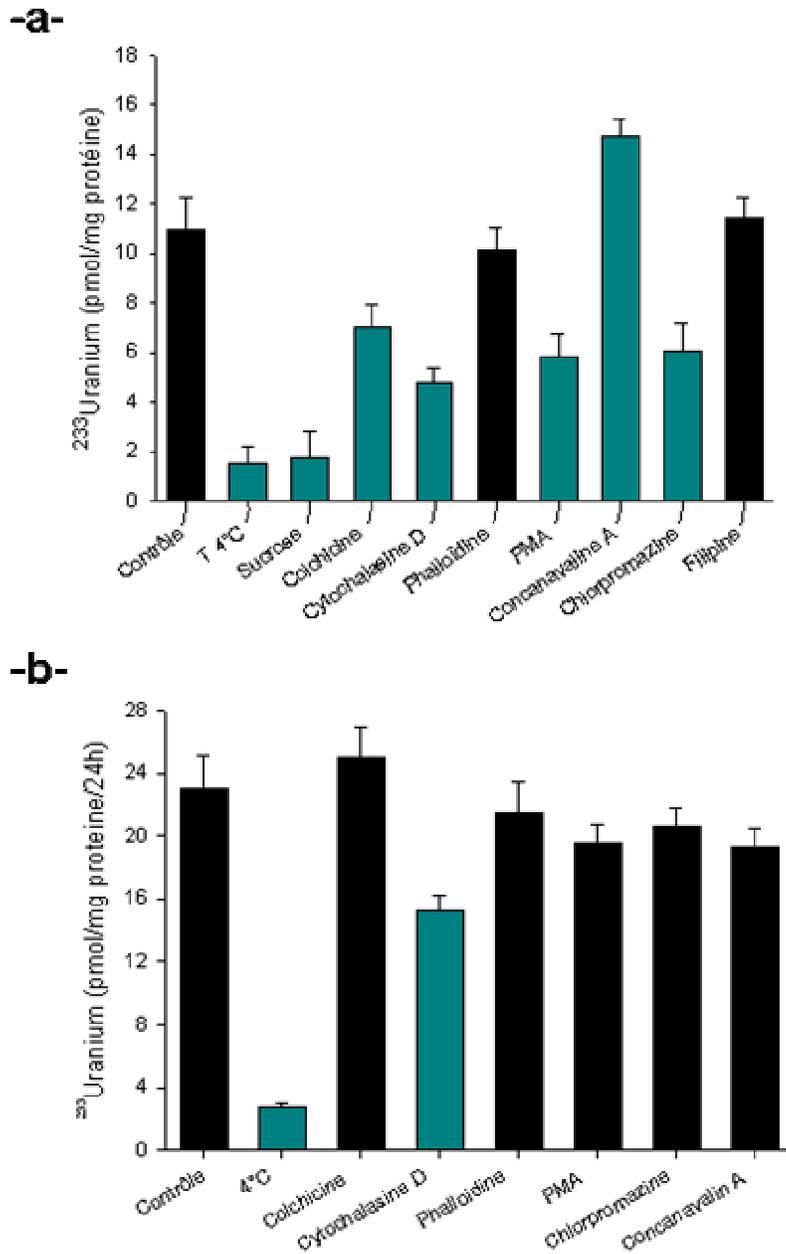
Afin de s'assurer que le mécanisme par lequel l'albumine est internalisée par les cellules LLC-PK<sub>1</sub> est uniquement un processus clathrine-dépendant, nous avons testé l'effet de la filipine, un agent liant les groupements stéroïdes, et connu pour inhiber spécifiquement l'endocytose cavéoline-dépendante (Schnitzer *et al*, 1994). Ici, le traitement des cellules avec une concentration en filipine de 5 mg/l n'a pas induit d'effet significatif sur l'endocytose de l'albumine, et suggère donc que l'internalisation de cette dernière est principalement un processus clathrine-dépendant.

### III.3/ L'endocytose : mécanisme principal de réabsorption de l'uranium

Ayant déterminé l'effet de plusieurs conditions expérimentales et agents pharmacologiques sur l'endocytose *via* les puits tapissés de clathrine, nous avons alors caractérisé leur action sur le transport de l'uranium. En considérant l'hypothèse selon laquelle l'uranium serait réabsorbé par les cellules tubulaires proximales *via* un mécanisme endocytique, l'inhibition d'endocytose devrait alors s'accompagner d'une réduction du taux d'accumulation intracellulaire en uranium.

Ainsi, afin de vérifier que l'endocytose est bel et bien le processus principal de transport de l'uranium, les cellules LLC-PK<sub>1</sub> ont été prétraitées pendant 30 minutes avec les substances dont l'effet sur l'endocytose clathrine-dépendante a été précédemment caractérisé, puis incubées pendant 1 heure avec une concentration en uranium de 2  $\mu\text{mol/l}$ . Comme le montre la **figure 30a**, les résultats peuvent être corrélés avec ceux qui ont été initialement obtenus lors de l'étude de l'internalisation de l'albumine-fitc. Tout comme cette protéine, la diminution de la température et l'utilisation d'un milieu hypertonique (sucrose) sont, d'une part, les méthodes les plus efficaces pour inhiber le processus de transport de l'uranium et réduisent respectivement l'absorption de cet élément de 85.9 et 83.9%. D'autre part, la déstabilisation du cytosquelette cellulaire par la colchicine et la cytochalasine D induit également une réduction de 35.9 et 56.8% de l'activité de transport de l'uranium. De manière similaire, le pré-traitement des cellules par la chlorpromazine et le PMA inhibent partiellement, mais significativement l'internalisation de l'actinide : cette inhibition étant de 46.6% pour le PMA et de 45.1% pour la chlorpromazine. Enfin, tandis que la concanavaline A engendre un accroissement du cumul intracellulaire en uranium (+34.6%), la phalloïdine et la filipine n'ont aucun effet sur son absorption.

En revanche, lorsque ce même type d'étude est conduit sur une période d'incubation de 24 heures, un temps au bout duquel l'équilibre cinétique de transport est largement atteint, l'incubation à 4°C et la cytochalasine D sont les seuls facteurs capables d'inhiber significativement l'internalisation de l'uranium (**figure 30b**). Dans ces conditions expérimentales, l'inhibition induite par la température et par la cytochalasine D sont respectivement de 88 et 33.4%.



**Figure 30 : Endocytose et absorption de l'uranium par les cellules LLC-PK<sub>1</sub>.** Quantification de l'effet de l'incubation des cellules à 4°C, dans un milieu hyperosmolaire (sucrose), en présence de colchicine, cytochalasine D, phalloïdine, PMA, concanavaline A, chlorpromazine et de filipine sur l'absorption de l'uranium à 1 heure (-a-) et à 24 heures (-b-). La concentration en uranium  $^{233}$  utilisée au cours de cette série d'expérience est de 1  $\mu\text{mol/l}$ .

### **III.4/ Endocytose et cytotoxicité de l'uranium**

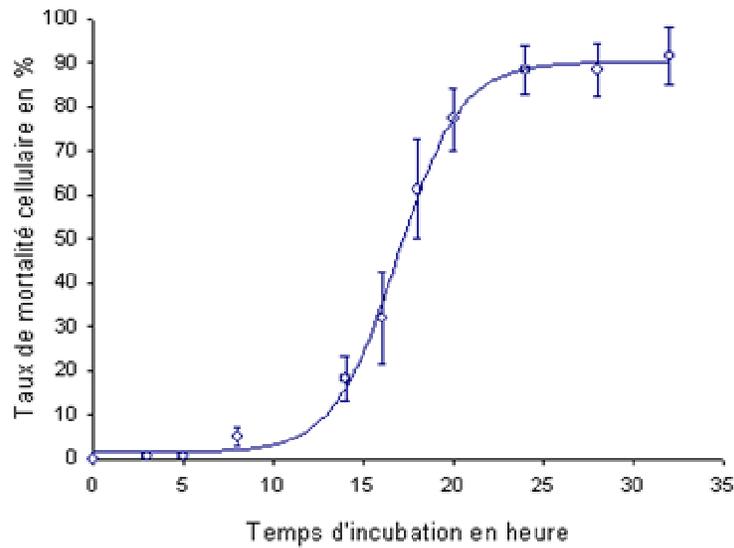
#### **III.4.1/ Mesure de la cytotoxicité**

L'atteinte toxique cellulaire générée par les métaux peut être très diverse et engendrer soit l'apoptose, soit la nécrose. Cependant, lorsque les études de toxicité sont effectuées *in vitro*, avec un système d'incubation statique, quel que soit le type de mort cellulaire induit par l'agent toxique, il en résulte *in fine* la désintégration de la membrane plasmique de la cellule. A cette désintégration, s'associe une dispersion des organites cellulaires et des composants cytoplasmiques dans le fluide extracellulaire. Parmi ces composés, on retrouve ainsi des protéines adaptatrices impliquées dans certains processus cellulaires tels que l'endocytose, des séquences nucléotidiques, mais également des enzymes impliquées dans les voies signalétiques ou encore dans le métabolisme cellulaire. La lactate déshydrogénase (LDH) étant un enzyme cytosolique, son activité dans le milieu extracellulaire peut par conséquent être directement corrélée à la quantité de cellules lysées. Nous avons donc mesuré le degré de toxicité de l'uranium par l'intermédiaire du dosage dans le milieu d'incubation de l'activité de la LDH.

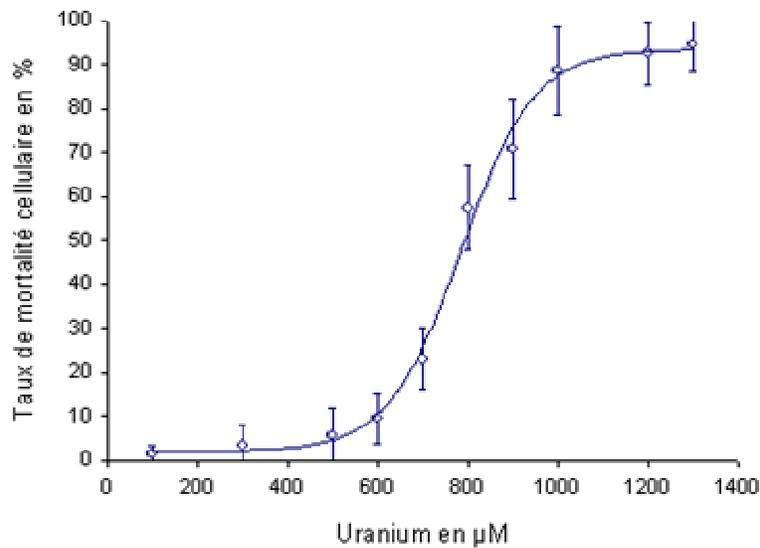
#### **III.4.2/ Détermination des caractéristiques cytotoxiques de l'uranium**

Les premiers résultats montrent que la cytotoxicité induite par l'uranium est le résultat d'une atteinte cellulaire qui dépend à la fois du temps d'exposition (**figure 31a**) et de la concentration en uranium (**figure 31b**). Ainsi, dans le modèle cellulaire LLC-PK<sub>1</sub>, la cytotoxicité engendrée par 1 mmol/l d'uranium n'est observable qu'à partir de la 10<sup>ème</sup> heure d'exposition et est maximale au bout de 24 heures. Lorsque les études sont effectuées sur une période d'incubation de 24 heures, la cytotoxicité générée en fonction de la concentration en uranium croît selon un modèle mathématique sigmoïde. De manière intéressante, la fenêtre de toxicité est très étroite : elle débute lorsque la concentration de l'actinide est de 500 µmol/l et atteint son maximum pour une concentration de 1000 µmol/l. La concentration létale provoquant 50% de mortalité cellulaire (CL<sub>50</sub>) étant de 790 ± 14.5 µmol/l, nous avons choisi cette concentration comme valeur de référence pour l'étude de l'impact des agents pharmacologiques et conditions expérimentales sur la cytotoxicité de l'uranium.

**-a-**



**-b-**



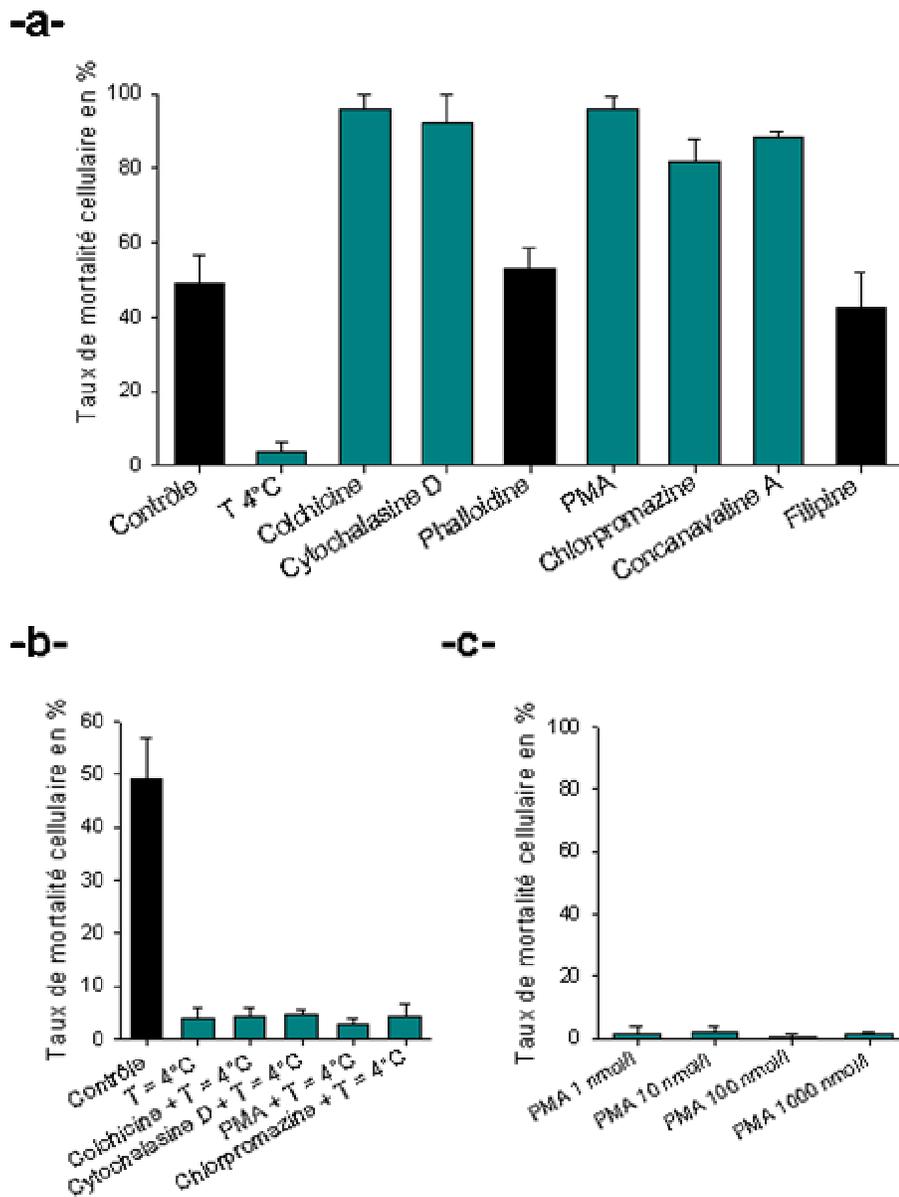
**Figure 31 : Cytotoxicité de l'uranium.**

**(-a-)** Cinétique d'intoxication obtenue à partir d'une concentration de 1 mmol/l en uranium et sur une échelle de temps comprise entre 0 et 32 heures **(-b-)** Taux de mortalité induit en fonction de la concentration en uranium pour une période d'incubation de 24 heures.

### **III.4.3/ Rôle de l'endocytose vis-à-vis de la cytotoxicité de l'uranium**

Puisque les résultats précédents laissent suggérer que le mécanisme principal de transport de l'uranium est un processus endocytique clathrine-dépendant, il est alors logique de supposer que l'inhibition ou la stimulation de ce dernier devrait respectivement engendrer une réduction ou une augmentation de la toxicité de l'uranium. Afin de vérifier cette hypothèse, les cellules LLC-PK<sub>1</sub> ont été exposées soit à 37°C, soit à 4°C, à une concentration de 800 µmol/l en uranium sur une période de 24 heures en présence ou en absence des différentes molécules précédemment testées (**figure 32a**). De manière surprenante, seule l'incubation des cellules à 4°C diminue significativement le taux de mortalité cellulaire induit par l'uranium. Cette diminution de toxicité, qui atteint un facteur 13, est entièrement corrélée à l'inhibition du transport trans-membranaire de l'uranium obtenue dans les mêmes conditions expérimentales. En revanche, la colchicine, la cytochalasine D, le PMA et la chlorpromazine, qui ont été démontrés être des inhibiteurs de l'endocytose clathrine-dépendante et du processus cellulaire responsable du transport de l'uranium 233, provoquent une augmentation de sa cytotoxicité (facteur 2). Au vu de ces résultats, deux hypothèses peuvent alors être énoncées : (i) la première étant un effet additif de la toxicité des agents pharmacologiques testés à celle de l'uranium, (ii) et la seconde étant que l'endocytose, outre le fait d'être la voie majoritaire d'absorption de l'uranium, est aussi un mécanisme cellulaire de régulation de l'activité d'un second, voire plusieurs, système membranaire à l'origine du transport de la fraction cytotoxique de l'uranium. Cependant, puisque l'incubation des cellules à 4°C en présence des substances testées supprime totalement la toxicité de l'actinide (**figure 32b**), et que les agents pharmacologiques ne sont pas toxiques aux concentrations utilisées, l'hypothèse d'une additivité de toxicité n'est pas vérifiée. Cela est d'autant plus probant, que lors de notre étude, le PMA est incubé à une concentration de 10 nmol/l, et que ce dernier n'engendre pas d'effet toxique mesurable pour des concentrations 100 fois plus importantes (**figure 32c**).

Enfin, puisque la phalloïdine et la filipine n'ont aucun effet sur le taux de mortalité cellulaire généré par l'actinide (**figure 32a**), ces résultats apportent une preuve supplémentaire sur le fait que la toxico-cinétique de l'actinide implique un processus clathrine-dépendant.



**Figure 32 : Endocytose et cytotoxicité induite par l'uranium.**

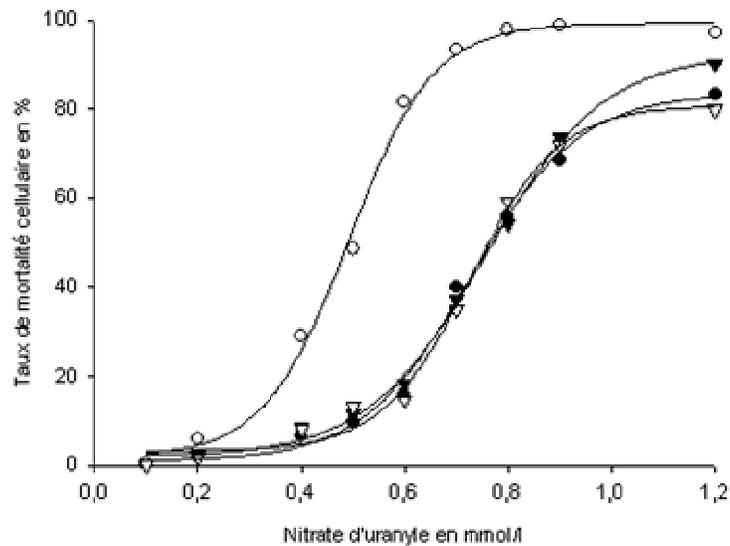
Les cellules LLC-PK<sub>1</sub> ont été incubées pendant 24 heures dans un milieu physiologique en présence de 0.8 mmol/l d'uranium (~CL<sub>50</sub>), et le taux de mortalité cellulaire induit a été mesuré par l'intermédiaire du dosage dans le milieu extracellulaire de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH). **(-a-)** Effet de la température, du PMA, de la cytochalasine D, de la colchicine, de la phalloïdine, de la chlorpromazine, de la concanavaline A et de la filipine sur la cytotoxicité de l'uranium. **(-b-)** Effet de la température sur la potentialisation de la cytotoxicité de l'uranium par la colchicine, la cytochalasine D, le PMA et la chlorpromazine. **(-c-)** Toxicité du PMA.

#### **III.4.4/ Spécificité de l'effet du PMA**

Afin de vérifier que l'augmentation de la cytotoxicité de l'uranium induite par le PMA est un effet spécifique qui est directement couplé au taux d'activation de PKC, les cellules LLC-PK<sub>1</sub> ont été incubées en présence d'une gamme de concentrations croissantes en uranium et traitées soit avec 10 nmol/l de PMA, soit avec 1 µmol/l de bisindolylmaléimide (Bim), un inhibiteur de PKC, ou encore avec 10 nmol/l de PMA et 1 µmol/l de bisindolylmaléimide. Comme le montre la **figure 33**, tandis que le bisindolylmaléimide n'a aucun effet sur la cytotoxicité de l'uranium, en revanche, le traitement des cellules avec cet inhibiteur de PKC abolit totalement l'effet du PMA. A partir de ces résultats, il peut ainsi en être déduit que soit la cytotoxicité induite par l'uranium, soit le processus de transport, dépend d'une voie signalétique intracellulaire au niveau de laquelle PKC est un des facteurs de régulation. Or, l'administration de Bim en absence de PMA ne réduit pas la cytotoxicité générée par l'uranium, ce qui suggère que le taux initial d'activité de PKC n'est pas altéré par l'actinide. Nous proposons donc que cette sérine/thréonine kinase est impliquée dans la régulation du (des) processus impliqué(s) dans l'absorption de l'uranium.

#### **IV/ Discussion**

Bien qu'il soit généralement admis que la réabsorption tubulaire proximale de l'uranium est un processus endocytaire, et que la toxicité cellulaire engendrée est la conséquence de son accumulation au sein de lysosomes, la première partie de ce travail démontre que les mécanismes impliqués sont quelque peu plus complexes et très certainement multiples. En premier lieu, après avoir caractérisé l'effet pharmacologique de nombreuses substances et conditions expérimentales sur l'activité endocytaire de l'albumine-fic, nous avons démontré que l'inhibition de ce processus s'accompagne d'une réduction significative de l'accumulation intracellulaire de l'uranium. De manière similaire, la concanavale A, dont l'action se résume en une stimulation de l'endocytose de l'albumine, engendre également une augmentation du taux de transport de l'actinide. Ainsi, l'hypothèse selon laquelle l'uranium serait réabsorbé *in vivo* par les cellules tubulaires proximales de l'épithélium rénal *via* un processus endocytaire semble se vérifier *in vitro* sur culture cellulaire. En effet, le système de transport de l'uranium est un processus qui, de façon identique à l'endocytose *via* les puits tapissés de clathrine, est dépendant de



**Figure 33 : Rôle de la PKC dans le cytotoxicité de l'uranium.**

Mesure de la cytotoxicité engendrée par l'uranium pour des concentrations s'échelonnant entre 0,1 et 1,2 mmol/l (●) en présence de PMA (○), un activateur de PKC, de bisindolylmaléimide (△), un inhibiteur de PKC, et de l'association PMA - bisindolylmaléimide (▲).

l'état du cytosquelette d'actine et du réseau microtubulaire, régulé par une cascade signalétique intracellulaire impliquant la protéine kinase C, inhibé par des agents pharmacologiques à l'origine d'un mauvais assemblage de la cage de clathrine autour des vésicules d'endocytose, et enfin, non altéré par la filipine, un inhibiteur spécifique de l'endocytose cavéoline-dépendante. Par analogie avec l'effet de ces substances sur l'endocytose de l'albumine-fitc, nous proposons par conséquent que l'uranium est principalement transporté du milieu extracellulaire vers le compartiment cytoplasmique par l'intermédiaire d'un mécanisme endocytique clathrine-dépendant.

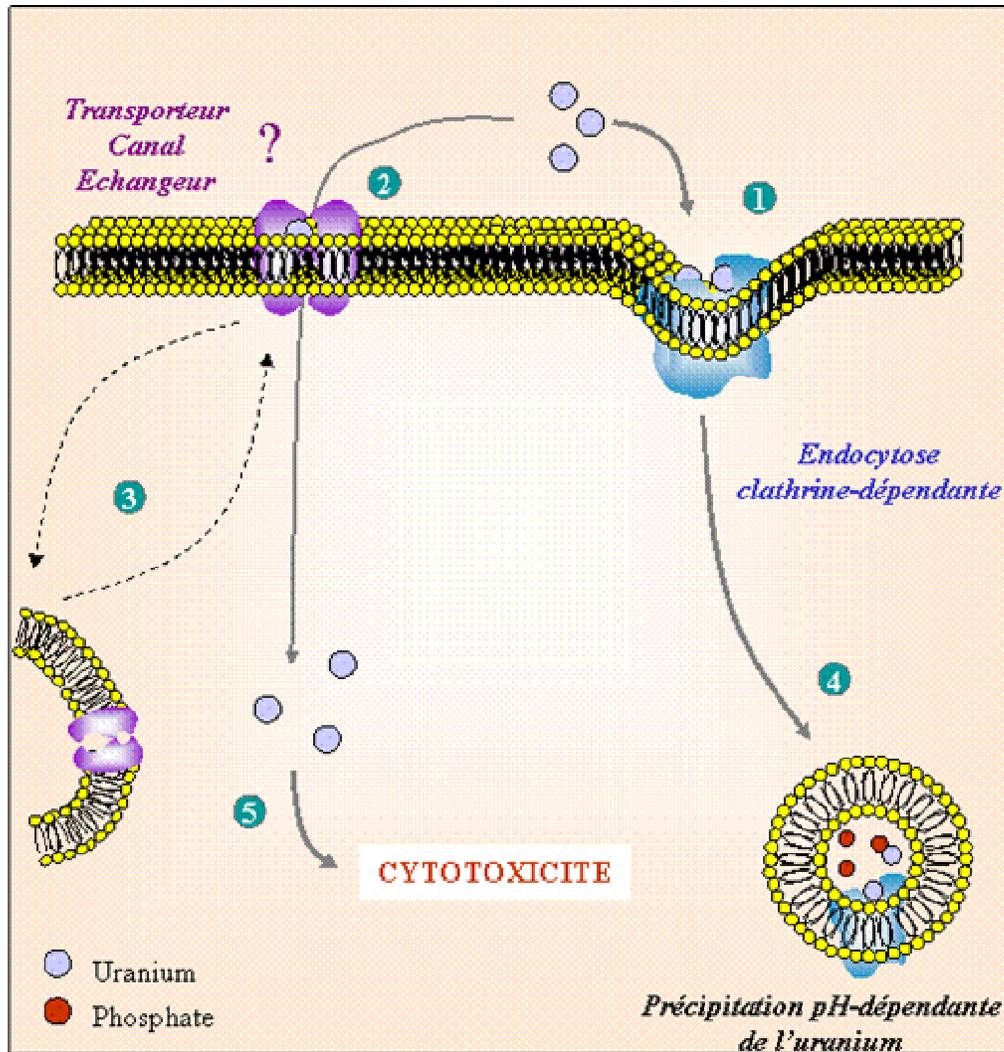
Cependant, tandis qu'il est logique de s'attendre à ce que l'inhibition de l'absorption de l'uranium provoque une réduction significative de la toxicité engendrée par cet élément, il s'avère au contraire, que celle-ci s'accompagne d'une potentialisation de l'effet toxique. Deux hypothèses ont alors été proposées afin de tenter d'expliquer l'obtention de tels résultats : la première faisant référence à une éventuelle additivité de la toxicité de l'uranium et des substance utilisées au cours de l'étude ; et la seconde postulant pour l'existence d'un second processus de transport à l'origine de l'absorption par les cellules de la fraction d'uranium responsable de sa cytotoxicité. Or, nous avons démontré que la première hypothèse ne pouvait pas expliquer les résultats que nous avons obtenus : d'une part, parce que les substances testées ne sont pas toxiques aux concentrations utilisées (**Figure 24 et tableau VII**); d'autre part, parce que l'effet stimulateur du PMA sur la cytotoxicité de l'uranium est totalement supprimé en présence d'un inhibiteur de PKC, et suggère que la potentialisation de l'effet toxique de l'uranium par le PMA est spécifiquement couplé au taux d'activation de PKC ; et enfin, parce tous les effets de potentialisation sont entièrement abolis lorsque les cellules sont incubées à 4°C.

Il est donc concevable d'envisager l'existence d'un deuxième processus de transport de l'uranium, dont la régulation serait étroitement lié à l'activité endocytique. Cette hypothèse est d'autant plus pertinente, que l'endocytose est connue pour jouer un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions cellulaires. Parmi celles-ci, les principales sont : le contrôle de l'état d'activation des récepteurs membranaires et la régulation de la transduction du signal (Koenig *et al*, 1997 ; Ceresa et Schmid, 2000 ; Kristen *et al*, 2002), la présentation d'antigène (Shen *et al*, 2000), le maintien de la polarité cellulaire ou encore la régulation de l'activité membranaire d'un grand nombre de canaux et transporteurs. C'est ainsi, qu'au cours

de cette dernière décennie, il a été démontré que l'acidification de la lumière tubulaire proximale *via* l'échangeur NHE3 (Chow *et al*, 1999 ; Collazo *et al*, 2000 ; Hu *et al*, 2001), que la réabsorption rénale sodium-dépendante du phosphate *via* le co-transporteur NaPi IIa (Murer et Biber, 1996 ; Traebert *et al*, 2000 ; Hernando *et al*, 2001), ou encore que l'activité du canal sodique ENaC (Shimkets *et al*, 1997) sont des mécanismes étroitement régulés par les processus endo- et exocytiques. Il a notamment été démontré que l'inhibition de l'endocytose s'accompagne d'une augmentation du  $V_{max}$  et par conséquent d'une stimulation de l'activité de transport.

Ainsi, d'après les résultats obtenus, nous suggérons que l'uranium est absorbé au moins par l'intermédiaire de deux mécanismes, l'un étant un processus endocytique clathrine-dépendant, et l'autre étant un mécanisme dont l'activité de transport est régulée par les processus endo- et exocytiques. Cette hypothèse est notamment étayée par le fait que l'incubation des cellules à une température de 4 °C, une condition expérimentale connue pour bloquer indifféremment un grand nombre de mécanismes de transport, inhibe l'absorption de l'uranium et supprime totalement sa toxicité. D'après ce concept, puisque nous avons démontré que l'inhibition de l'endocytose provoque une diminution de l'absorption de l'uranium, nous suggérons également que l'endocytose clathrine-dépendante est le mécanisme principal de transport, et que le second processus n'est responsable que de l'absorption d'une petite fraction d'uranium.

Dans ce cas, tandis que l'uranium absorbé par endocytose serait accumulé sous la forme précipitée non-toxique de phosphate d'uranyle au sein des lysosomes, la fraction absorbé par le second système de transport serait transférée dans le cytosol et correspondrait à la fraction cytotoxique (**figure 34**). Les études de cytotoxicité et de cinétique du transport de l'uranium conforte ce postulat. En effet, tandis que la caractérisation des paramètres cinétiques du transport de l'uranium montre que ce dernier est principalement absorbé *via* un système de transport dont la saturation est atteinte pour des concentrations en uranium de l'ordre du micromolaire ( $K_d$   $1.105 \pm 0.175 \mu\text{mol/l}$  ;  $V_{max} = 16.96 \pm 0.92 \text{ pmol/mg de protéine}$ ), la cytotoxicité de l'actinide n'est atteinte que lorsque sa concentration est de l'ordre du millimolaire (0.5 à 1 mmol/l).



**Figure 34 : Transport et toxicité de l'uranium.**

D'après les résultats de cytotoxicité et de transport, il peut être postulé que l'uranium est transporté *via* 2 processus membranaires : le premier étant un mécanisme endocytique clathrine-dépendant (1), et le second étant très probablement un transporteur, un canal ou encore un échangeur (2). En outre, l'activité de ce dernier serait régulée par les processus endo- et exocytiques (3). L'uranium serait principalement absorbé par endocytose et minoritairement *via* le second système de transport. Ainsi, l'uranium endocyté serait transféré vers les lysosomes *via* les endosomes et précipiterait sous la forme de microcristaux de phosphate d'uranyle de manière pH-dépendante (4). En revanche, l'uranium absorbé par l'intermédiaire du second mécanisme serait transféré dans le cytoplasme cellulaire et serait à l'origine de l'effet toxique (5).

En conclusion, les résultats que nous avons obtenus au cours de cette première partie nous suggèrent qu'il existe au niveau de la membrane cellulaire au moins deux processus de transport pour l'uranium. Il semblerait ainsi que la majeure partie de l'actinide absorbée le soit par l'endocytose clathrine-dépendante, et que la fraction cytotoxique de l'uranium le soit par un système de transport dont l'activité serait, en partie, négativement rétro-réglée par un mécanisme endocytaire. De la sorte, bien que l'inhibition de l'endocytose clathrine-dépendante résulterait en une diminution du taux de transport de l'uranium, elle serait, d'autre part, également responsable de l'augmentation de sa charge intracellulaire cytotoxique. Ce concept pouvant s'appliquer à nos résultats, nous avons par conséquent cherché à déterminer quel pouvait être le second système de transport de l'uranium

## CYTOTOXICITE DE L'URANIUM : ROLE DU CO-TRANSPORTEUR NaPi IIa

### I/ Objectifs et hypothèse

Les résultats que nous avons précédemment obtenus suggèrent que la fraction cytotoxique de l'uranium est transportée par l'intermédiaire d'un mécanisme différent du processus endocytique. Cependant, puisque l'inhibition d'endocytose provoque également une potentialisation de la toxicité de l'uranium, il peut en être déduit que le système de transport impliqué est en partie régulé par un processus endocytique. **Nous avons par conséquent cherché à déterminer au cours de la deuxième partie de notre travail le processus cellulaire responsable du transport de la fraction cytotoxique de l'uranium.**

Puisque les deux organes de dépôt sont principalement les os et les reins, et qu'une des fonctions physiologiques communes entre ces deux organes est le maintien et le contrôle de la balance du calcium et du phosphate sanguins, nous avons axé nos travaux selon l'hypothèse qu'il existerait un lien direct entre le maintien de l'homéostasie générale de ces deux éléments dans l'organisme et la cytotoxicité induite par l'actinide.

Les concentrations plasmatiques en phosphate et en calcium sont étroitement liées et finement régulées, d'une part, par une modulation du taux de leur réabsorption rénale, et d'autre part, par une modification *in situ* de l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes dont les fonctions sont respectivement l'élaboration et la dégradation de la matrice minérale osseuse, l'hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{HPO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Or, il a récemment été démontré *in vitro* que l'uranium est capable d'engendrer une altération du taux d'expression de l'oncogène RAS dans les cellules ostéoblastiques HOS d'origine humaine, et que celle-ci est associée à la transformation des cellules en un phénotype néoplasique (Miller *et al*, 1998, 2001). Ainsi, bien que les mécanismes de dépôt de l'uranium au sein de la matrice osseuse ne soient pas encore connus, il se pourrait que l'actinide transite préalablement par les cellules ostéoblastiques qui, rappelons-le, sont à l'origine de la synthèse de l'hydroxyapatite,

zone de dépôt de l'uranium. Si tel est le cas, il est donc probable qu'il existe un système de transport commun, exprimé par les cellules de l'épithélium tubulaire proximal et par les ostéoblastes, qui serait à l'origine du transport de la fraction cytotoxique de l'uranium. Dans ce cas, il est concevable que le système de transport impliqué corresponde soit au processus de réabsorption du calcium, soit à celui du phosphate. En effet, si l'on se réfère au devenir de ces deux électrolytes dans le rein, plus de 70% du calcium (Friedman et Gesek, 1995 ; Suki et Rouse, 1996) et 90% du phosphate (Baumann *et al*, 1975 ; Suki et Rouse, 1996) contenus dans l'urine primitive sont réabsorbés au niveau du tubule proximal.

La réabsorption du calcium étant cependant un processus passif, correspondant à un transport para-cellulaire secondaire à l'absorption du sodium et de l'eau *via* les jonctions serrées, ce mécanisme ne peut donc pas être à l'origine de la toxicité cellulaire de l'uranium. En revanche, puisque la réabsorption du phosphate inorganique s'effectue par l'intermédiaire d'un système de transport actif secondaire (pour revue : Murer *et al*, 2000), le co-transporteur NaPi IIa, dont l'activité est finement contrôlée par les processus endo- et exocytiques, est donc un candidat potentiel. Cette hypothèse est d'autant plus pertinente que le co-transporteur NaPi IIa appartient à une famille de co-transporteurs sodium-dépendant qui regroupe 3 sous-familles, et que l'un des membres de la sous-famille des co-transporteurs NaPi III est fortement exprimé dans les cellules ostéoblastiques (Palmer *et al*, 1997 ; Nielsen *et al*, 2001).

## **II/ Homéostasie du phosphate et du calcium, et cytotoxicité de l'uranium**

Afin de déterminer si le système de transport que nous recherchons est directement couplé à l'homéostasie du phosphate et du calcium, les cellules LLC-PK<sub>1</sub> ont été incubées pendant 24 heures avec une gamme de concentrations croissantes en uranium, diluées dans deux milieux de cultures composés respectivement de concentrations variables en phosphate et en calcium.

### **II.1/ Effet de la concentration en phosphate**

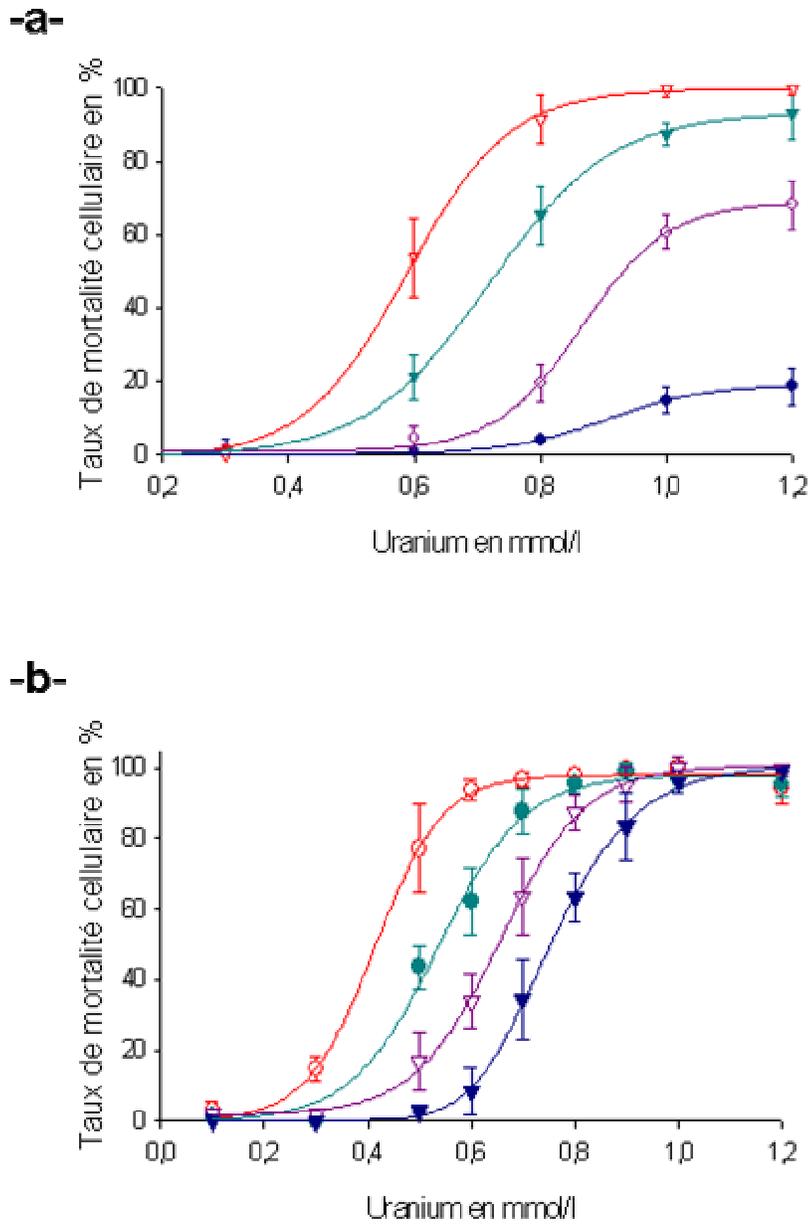
La **figure 35a** montre que lorsque la concentration en phosphate dans le milieu d'incubation est 2 mmol/l la cytotoxicité de l'uranium croît de manière sigmoïdale et atteint 100% pour des concentrations en uranium comprises entre 0.9 et 1 mmol/l. En revanche, lorsque la concentration en phosphate dans le milieu extracellulaire est réduite, on observe une diminution significative et dépendante de la concentration de la cytotoxicité de l'uranium. En effet, pour des concentrations en phosphate de 1, 0.5 et 0.1 mmol/l, la cytotoxicité induite par 0.8 mmol/l d'uranium, qui engendre un taux de mortalité cellulaire d'environ 93% pour une concentration en phosphate de 2 mmol/l, est respectivement de 63, 19 et 4%. Il est également intéressant de noter que le taux maximal de mortalité induite par l'uranium est directement dépendant de la concentration en phosphate. Ainsi, tandis que pour une concentration en phosphate de 2 mmol/l le taux maximal de mortalité est de 100%, il n'est plus que de 88% lorsque la concentration en phosphate est de 1 mmol/l, de 64% à 0.5 mmol/l et de 18% à 0.1 mmol/l.

### **II.2/ Effet de la concentration en calcium**

Contrairement aux effets observés avec le phosphate, lorsque la concentration en calcium extracellulaire est réduite de 2 mmol/l à 0.1 mmol/l, la cytotoxicité de l'uranium est cette fois-ci significativement augmentée (**figure 35b**). Par exemple, tandis que pour une concentration en calcium de 2 mmol/l l'effet cytotoxique engendré par une concentration en uranium de 0.5 mmol/l est de 3%, il est respectivement de 17, 44 et 78% pour des concentrations en calcium de 1, 0.5 et 0.1 mmol/l. De plus, il apparaît que le taux maximal de mortalité cellulaire induite par l'uranium est cette fois-ci indépendante de la concentration en calcium. En effet, quelque soit la concentration en calcium, il est de 100% lorsque la concentration en uranium atteint 1 mmol/l.

### **II.3/ Conclusion**

Ces résultats montrent ainsi que la cytotoxicité de l'uranium est étroitement proportionnelle à la concentration en phosphate, et inversement proportionnelle à la concentration en calcium. Ces observations semblent donc vérifier *in vitro* l'hypothèse de l'existence d'un lien potentiel entre l'homéostasie du phosphate et du calcium sanguin et l'atteinte tubulaire proximale générée par l'uranium.



**Figure 35** : Rôle du phosphate et du calcium vis-à-vis de la toxicité de l'uranium.

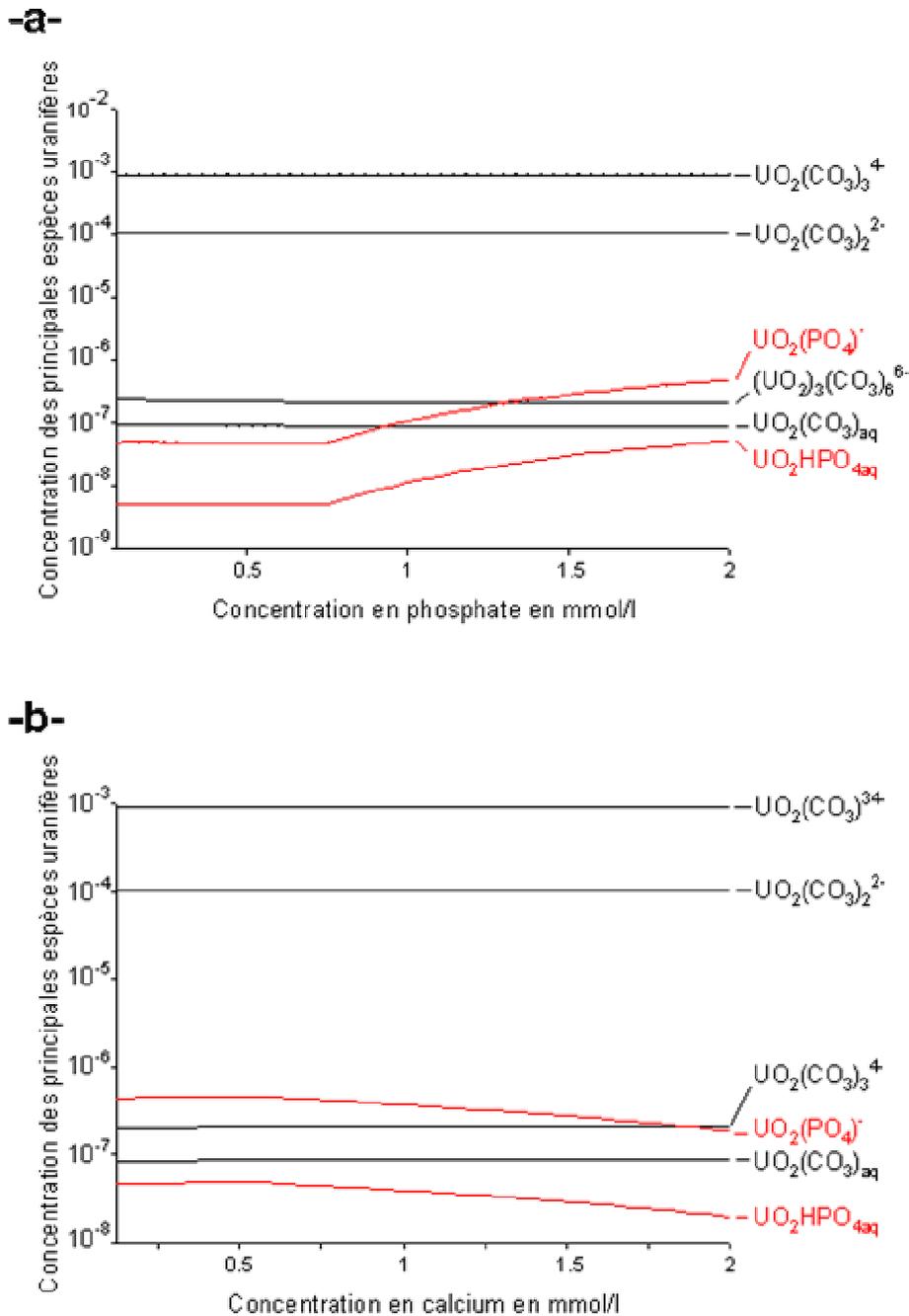
Effet de la concentration en phosphate (-a-) et de la concentration en calcium (-b-) sur la cytotoxicité cellulaire induite par l'uranium. Les concentrations en phosphate et en calcium sont respectivement : 0.1 (●) - 0.5 (○) - 1 (▼) et 2 mmol/l (▽), et 0.1 (○) - 0.5 (●) - 1 (▽) et 2 mmol/l (▼).

### III/ Spéciation de l'uranium en fonction des concentrations extracellulaires en phosphate et en calcium

Tandis que l'atténuation de la cytotoxicité de l'uranium peut être expliquée par une diminution des complexes uranyle-phosphate lorsque la concentration en phosphate dans le milieu d'incubation est réduite, l'obtention d'une potentialisation de toxicité lorsque la charge en calcium est diminuée est cependant difficile à interpréter. Nous avons donc étudié l'impact de ces variations de concentration sur la répartition théorique des espèces chimiques de l'uranium en solution (**figure 36**). La concentration en uranium a été fixée à 1 mmol/l et les nombreux paramètres expérimentaux correspondant aux conditions expérimentales utilisées lors des tests de cytotoxicité ont également été inclus dans la modélisation. Il s'agit des concentrations en ions bicarbonate, sulfate, nitrate, magnésium, sodium, potassium et chlore, ainsi que de la température et du pH.

Les **figures 36a et 36b** illustrent ainsi la répartition théorique des principales espèces uranifères présentes en solution respectivement en fonction de la charge extracellulaire en phosphate et en calcium. Il peut ainsi être mis en évidence que la réduction de la concentration de ces deux ions dans le milieu d'incubation provoque une modification unique et spécifique de la charge extracellulaire des complexes uranyle-phosphate. Les concentrations des nombreux autres complexes, et notamment des complexes  $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$ ,  $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$ ,  $(\text{UO}_2)_3(\text{CO}_3)_6^{6-}$  et  $\text{UO}_2\text{CO}_3$ , ne sont en effet pas significativement modifiées. D'après la modélisation, la diminution de la concentration en phosphate s'accompagne d'une réduction des complexes de type uranyle-phosphate (**figure 36a**) et peut donc expliquer la diminution de la cytotoxicité qui a été précédemment observée. De manière similaire, la réduction de la charge extracellulaire en calcium engendre une augmentation de la concentration de ces complexes (**figure 36b**) et peut ainsi être assimilée à la potentialisation de l'effet cytotoxique de l'uranium.

Ces observations théoriques sont donc en parfait accord avec les études de toxicité précédemment obtenues si l'on considère l'hypothèse que la fraction cytotoxique de l'uranium correspond à un complexe de type uranyle-phosphate.



**Figure 36 : Diagrammes de spéciation de deux solutions d'uranium en fonction de la concentration en phosphate (-a-) et de la concentration en calcium dans le milieu d'incubation.**

Les conditions expérimentales qui ont été choisies sont les suivantes :  
 $[U] = 1 \text{ mmol/l}$  ,  $[HCO_3^-] = 33.4 \text{ mmol/l}$  ,  $[Na^+] = 145 \text{ mmol/l}$  ,  $[K^+] = 5.3 \text{ mmol/l}$  ,  
 $[Cl^-] = 126 \text{ mmol/l}$  ;  $[NO_3^-] = 2.31 \text{ } \mu\text{mol/l}$  ;  $[SO_4^{2-}] = 0.811 \text{ mmol/l}$  ;  
 $[Mg^{2+}] = 0.811 \text{ mmol/l}$  ,  $\text{pH} = 7.2$  ; température =  $37^\circ\text{C}$  ; et selon le cas :  
 $[Ca^{2+}] = 2.39 \text{ mmol/l}$  (-a-) ,  $[P_i] = 1 \text{ mmol/l}$  (-b-).

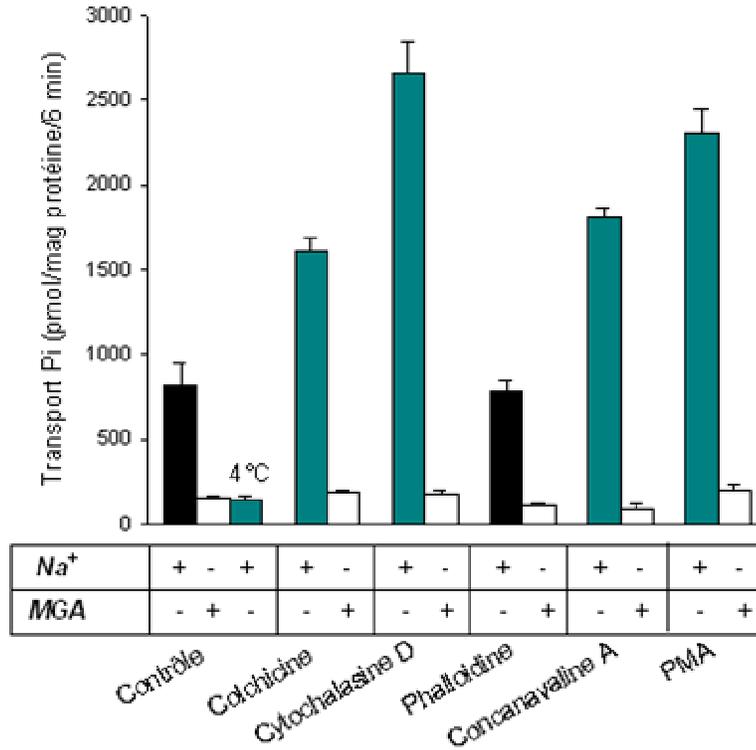
#### IV/ Cytotoxicité de l'uranium et transport du phosphate

Comme nous venons de le voir, la cytotoxicité engendrée par l'uranium soit directement couplée à la formation de complexes de type uranyle-phosphate dans le milieu extracellulaire. Ces observations suggèrent par conséquent que la fraction de l'uranium qui serait à l'origine de la cytotoxicité serait transportée par l'intermédiaire du mécanisme de transport du phosphate.

Nous avons donc déterminé au cours de cette série d'expérimentations si la potentialisation de l'effet cytotoxique de l'uranium, précédemment observée en présence d'agents tels que la cytochalasine D, pouvait être associée à une stimulation du taux de transport du phosphate. Pour cela, les cellules LLC-PK<sub>1</sub> ont été prétraitées pendant 30 minutes par la colchicine, la cytochalasine D, la phalloïdine, la concanavalline A ou le PMA, puis nous avons mesuré sur une période de 6 minutes le taux de transport du phosphate marqué au phosphore 32 dans deux conditions :

- soit avec un milieu d'incubation classique, où la concentration en sodium était de 145 mmol/l,
- soit avec un milieu d'incubation dans lequel le sodium avait été préalablement substitué par le *N*-méthyl-*D*-glucamine (MGA). Cette substitution du sodium par le MGA a été effectuée afin de supprimer le gradient électrochimique sodique et donc d'inhiber les systèmes de transport sodium-dépendant.

La **figure 37**, l'incubation des cellules à 4°C ou en absence de sodium supprime presque totalement l'assimilation du phosphate. Le transport de cet élément dans les cellules LLC-PK<sub>1</sub> est donc principalement un mécanisme actif et sodium-dépendant et confirme les résultats précédemment obtenus sur cette lignée cellulaire (Rabito, 1983 ; Biber *et al*, 1983). Il est surtout intéressant de noter que tous les composés qui potentialisaient l'effet cytotoxique de l'uranium, stimulent de manière significative l'activité de type NaPi (**figure 37 et tableau VIII**). Dans nos conditions expérimentales, la stimulation de l'activité de transport du phosphate s'étend ainsi d'un facteur 2.1 pour la colchicine à un facteur d'environ 3.7 pour la cytochalasine D. De plus, puisque le traitement des cellules par la phalloïdine n'a aucun effet sur le co-transport sodium-dépendant du phosphate, on retrouve ainsi un



**Figure 37 : Modification de l'activité du co-transporteur NaPi dans les cellules LLC-PK<sub>1</sub>.**

L'activité du co-transport sodium-dépendant du phosphate a été évaluée dans différentes conditions expérimentales. Les cellules LLC-PK<sub>1</sub> ont été pré-traitées pendant 30 minutes avec les molécules dont l'effet sur l'endocytose et sur la cytotoxicité de l'uranium a été précédemment caractérisé. Il s'agit de la colchicine, la cytochalasine D, la phalloïdine, la concanavalline A et le PMA. Le taux de transport du phosphate 32 a par la suite été mesuré sur une période de 6 minutes.

	Na <sup>+</sup>	MGA	p
Contrôle	812 ± 140	153 ± 15	-----
Colchicine	1605 ± 80 ***	183 ± 16	<0 01
Cytochalasine D	2665 ± 184 ***	178 ± 23	<0 01
Phalloïdine	784 ± 61	105 ± 11	-----
Concanavalline A	1810 ± 55 ***	86 ± 30	<0 01
PMA	2305 ± 142 ***	198 ± 37	<0 01

**Tableau VIII Modification de l'activité du co-transporteur NaPi dans les cellules LLC-PK<sub>1</sub>.**

profil d'activation en tout point équivalent au profil de cytotoxicité de l'uranium (**figure 32**).

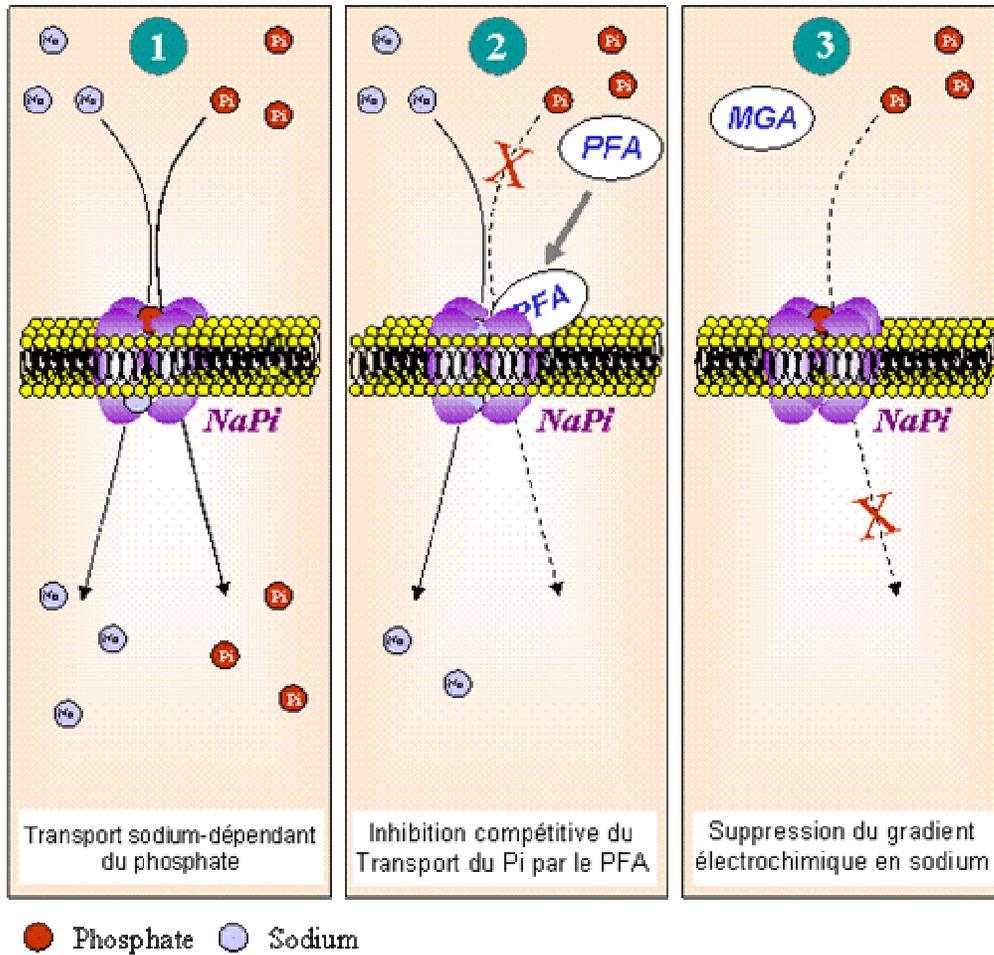
Ces résultats démontrent ainsi que les composés qui inhibent l'endocytose clathrine-dépendante stimulent, d'une part, l'activité du cotransporteur NaPi dans les cellules LLC-PK<sub>1</sub>, et potentialisent, d'autre part, la cytotoxicité de l'uranium. A partir de ces résultats, **il est donc logique de penser que le co-transporteur NaPi est le processus de transport de la fraction cytotoxique de l'uranium.**

## **VI/ Inhibition du co-transporteur de type NaPi, cytotoxicité et assimilation de l'uranium.**

Puisque jusqu'à présent, l'ensemble des composés testés générait une augmentation du taux d'activité NaPi, nous avons évalué dans les expériences qui ont suivi l'effet de l'inhibition spécifique de ce co-transporteur (**figure 38**). Pour cela, nous avons testé l'efficacité de l'acide phosphonoformique (PFA), un inhibiteur compétitif du transport du phosphate, puis l'effet de la suppression du gradient électrochimique sodique sur la cytotoxicité et l'absorption de l'uranium.

### **V.1/ Inhibition compétitive du co-transport NaPi**

Le PFA est un inhibiteur compétitif du co-transport sodium-dépendant du phosphate et présente une concentration inhibitrice 50%, ou  $K_i$ , qui a été évaluée à environ 0.45 mmol/l (Szczepanska-Konkel *et al*, 1986). Que ce soit *in vivo* ou *in vitro*, le PFA interagit directement avec le site de liaison du phosphate sur la surface externe de la membrane plasmique, et empêche de la sorte la formation du complexe tertiaire  $\text{Na}^+ / \text{Pi} / \text{co-transporteur}$  (Szczepanska-Konkel *et al*, 1987 ; VanScoy *et al*, 1988). Afin de tester l'efficacité inhibitrice potentielle de cette molécule sur la cytotoxicité et le transport de l'uranium, les cellules LLC-PK<sub>1</sub> ont été pré-incubées dans un milieu contenant 0.1, 1 ou 10 mmol/l de PFA pendant 60 minutes. Cette période de pré-incubation a été choisie dans le but d'atteindre l'équilibre de liaison entre cette molécule et le co-transporteur de type NaPi. Par la suite, les cellules ont été incubées dans un milieu composé des mêmes concentrations en PFA, soit pendant 24 heures en présence d'une gamme de



**Figure 36 : Méthodologie expérimentale de l'inhibition du transport du phosphate.** La réabsorption du phosphate est un processus sodium-dépendant (1) qui peut être inhibé de manière compétitive par l'acide phosphonoformique (PFA), qui se lie sur le site spécifique de liaison du phosphate (2), ou à la suite de la suppression du gradient électrochimique sodique lors de la substitution du sodium par le *N*-méthyl-*D*-glucamine (MGA) (3).

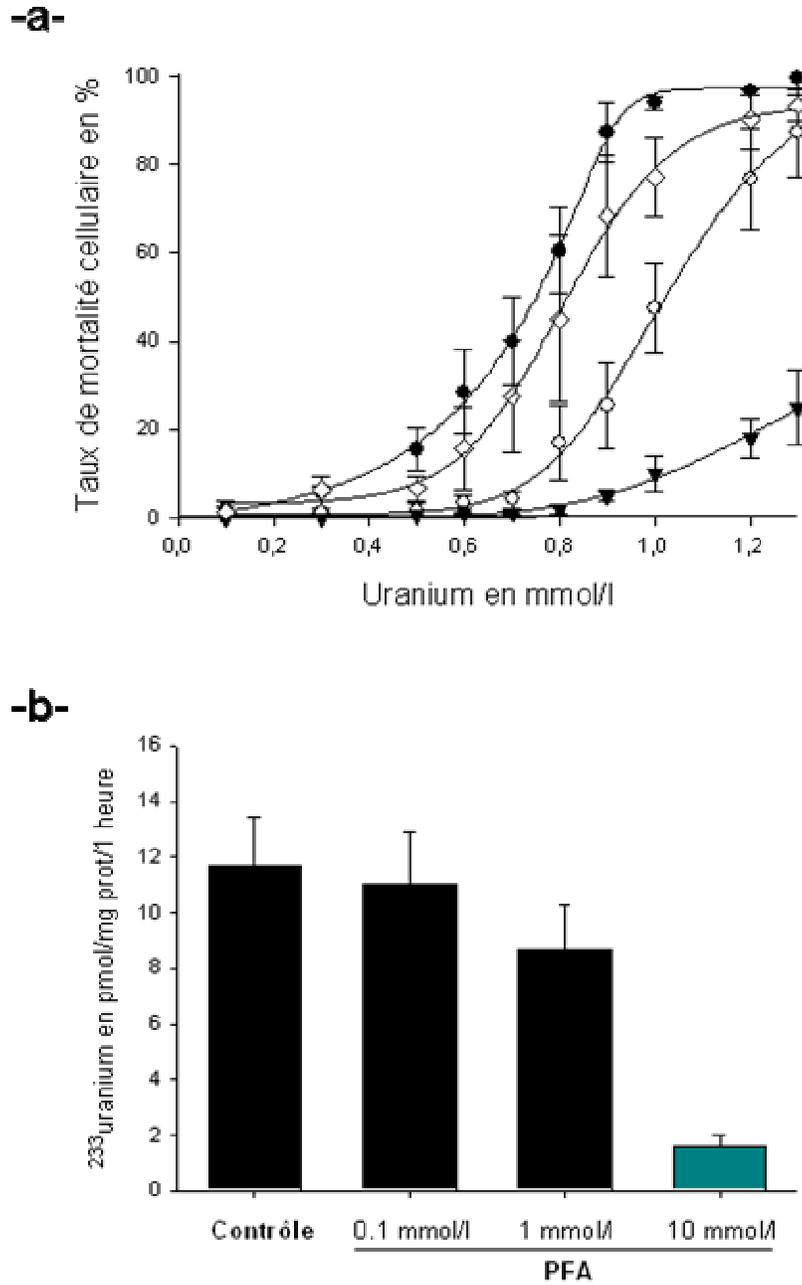
concentrations croissantes en uranium appauvri (test de cytotoxicité), soit pendant 1 heure avec 1  $\mu\text{mol/l}$  d'uranium 233 (mesure du transport de l'actinide).

La **figure 39a** met en évidence que le taux de mortalité cellulaire est significativement réduit par le PFA et que cet effet est directement proportionnel à la concentration administrée. Ainsi, pour des concentrations en inhibiteur de 0, 0.1, 1 et 10  $\text{mmol/l}$ , la  $\text{CL}_{50}$  de l'uranium est respectivement d'environ 0.75, 0.85, 1 et supérieure à 1.3  $\text{mmol/l}$ . En revanche, lorsque l'on étudie l'impact du PFA sur le transport de l'uranium, l'inhibiteur n'altère pas significativement l'absorption de l'actinide pour des concentrations de 0.1 et 1  $\text{mmol/l}$  (**figure 39b**). Seule une concentration de 10  $\text{mmol/l}$  de PFA dans le fluide extracellulaire supprime presque totalement le transport de l'uranium.

## **V.2/ Inhibition de l'activité du co-transporteur NaPi par la suppression du gradient électrochimique sodique.**

Le gradient électrochimique sodique, résultant de la différence de concentration en sodium qui existe de part et d'autre de la membrane plasmique, représente la force motrice nécessaire à l'activité du co-transporteur NaPi. Ainsi, la réduction de ce gradient électrochimique lors de la substitution du sodium par le *N*-méthyl-*D*-glucamine résulte en une élévation de la constante d'affinité du co-transporteur NaPi IIa pour le phosphate, et donc en une diminution de l'activité transport (Forster *et al*, 1999). Par conséquent, si la fraction cytotoxique de l'uranium est absorbée par les cellules *via* un co-transporteur de type NaPi, la réduction voire même la suppression totale du gradient électrochimique sodique devrait s'accompagner d'une diminution de la cytotoxicité engendrée par l'actinide. Afin de vérifier cette théorie, nous avons donc caractérisé l'effet de la substitution partielle du sodium par le *N*-méthyl-*D*-glucamine (MGA) dans le milieu d'incubation, d'une part sur la cytotoxicité de l'uranium, et d'autre part, sur son taux d'absorption par les cellules. Pour cela, les cellules LLC-PK<sub>1</sub> ont été incubées dans un milieu dont la concentration finale en sodium était soit de 45, soit de 145  $\text{mmol/l}$ .

La **figure 40a** montre que la réduction du gradient de concentration sodique provoque une réduction significative de la cytotoxicité de l'uranium. Cependant, de manière similaire à l'effet du PFA, il n'en demeure pas moins que le transport de



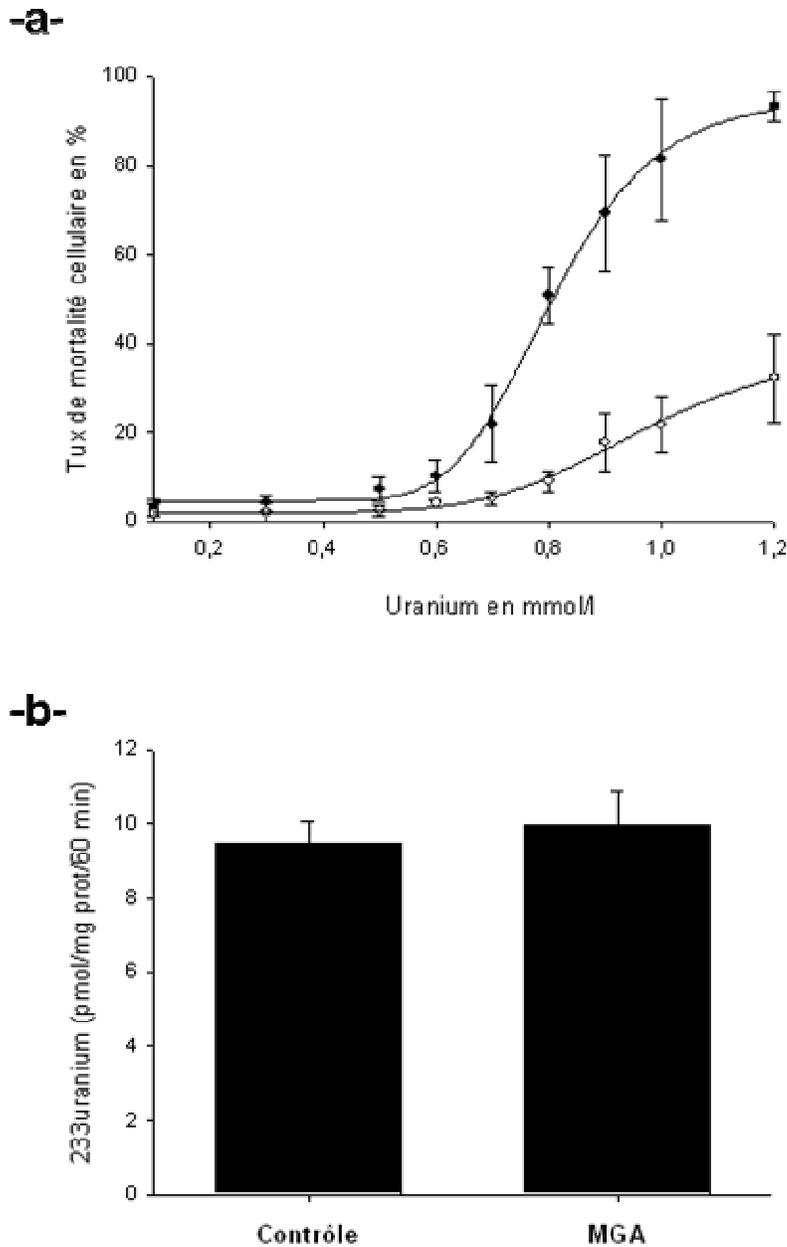
**Figure 39 : Inhibition compétitive du co-transporteur NaPi, transport et cytotoxicité de l'uranium.**

Effet de l'inhibition du co-transporteur NaPi par 0.1 (◇), 1 (○) et 10 mmol/l (▼) d'acide phosphonoforique sur la cytotoxicité (-a-) et le transport de l'uranium (-b-).

l'actinide reste inchangé quelle que soit l'amplitude de la force motrice (**figure 40b**). C'est ainsi que pour des concentrations extracellulaires respectives en sodium de 145 et 45 mmol/l, tandis que les taux de transport de l'uranium sont de  $9.48 \pm 0.57$  et  $9.99 \pm 0.91$  pmoles par mg de protéine totale et par heure, la  $CL_{50}$  est significativement augmentée. Cette dernière est de 0.8 mmol/l pour une concentration extracellulaire en sodium de 145 mmol/l, et supérieure à 1.2 mmol/l dans le deuxième cas.

## **VI/ Sur-expression d'un co-transporteur de type NaPi IIa, absorption et toxicité de l'uranium.**

Jusqu'à présent, l'ensemble des travaux ont été menés sur la lignée cellulaire LLC-PK<sub>1</sub>, d'origine de rein de porc. Or, bien que cette dernière possède un grand nombre des caractéristiques biochimiques, morphologiques et fonctionnelles appartenant aux cellules tubulaires proximales, elle diffère cependant de ces cellules à plusieurs niveaux. Il a par exemple été démontré que les cellules LLC-PK<sub>1</sub> n'expriment pas le transporteur d'anions organiques sensible à la probenicide (Rabito, 1986), ni le récepteur à l'hormone parathyroïdienne (Meier *et al*, 1985). Ce dernier étant cependant le déterminant majeur de la régulation hormonale de la réabsorption tubulaire du phosphate *in vivo*, et puisque la protéine responsable du co-transport NaPi dans la lignée cellulaire LLC-PK<sub>1</sub> n'est pas connue, l'analogie entre le mécanisme de transport du phosphate dans ces cellules et celui qui a lieu *in vivo* via le co-transporteur NaPi de type IIa est difficile à établir. D'autre part, bien que l'ensemble de nos travaux suggère que la fraction cytotoxique de l'uranium soit absorbée via le transport sodium-dépendant du phosphate, les agents pharmacologiques que nous avons étudiés sont également susceptibles d'induire une altération de processus de transport autre que le système NaPi. Par exemple, l'altération du cytosquelette d'actine par la cytochalasine D est également connue pour générer une potentialisation de l'activité membranaire de l'échangeur NHE3 (Chalumeau, 2001). Ainsi, afin de s'affranchir d'un biais expérimental quelconque, de confirmer les résultats précédemment acquis et de vérifier que la cytotoxicité de l'uranium est effectivement associée à l'activité du co-transporteur NaPi, nous avons caractérisé la toxico-cinétique de l'actinide sur un second modèle d'étude : la lignée cellulaire MDCK, d'origine tubulaire distale, et génétiquement modifiée. Etant donné



**Figure 40 : Inhibition du co-transport NaPi par suppression du gradient électrochimique sodique.**

Cytotoxicité (-a-) et transport de l'uranium (-b-) en fonction du gradient électrochimique sodique. Les cellules LLC-PK<sub>1</sub> ont été incubées soit dans un milieu traditionnel composé d'une concentration en sodium de 145 mmol/l (●), soit dans un milieu où le sodium a été partiellement remplacé par le *N*-méthyl-*D*-glucamine (MGA, ▼).

qu'*in vivo* la réabsorption du phosphate est effectuée *via* le co-transporteur NaPi IIa, qui est essentiellement localisé sur la surface apicale des cellules tubulaires proximales, les cellules MDCK représentent en effet un bon modèle de transfection pour ce co-transporteur. La lignée cellulaire MDCK, transfecté avec l'ADNc codant pour le co-transporteur rNaPi-2, un isoforme de la sous-famille IIa, et dont l'expression du gène est sous la dépendance d'un promoteur inductible au dexaméthasone (Quabius *et al*, 1996), nous a donc permis de caractériser spécifiquement le rôle des co-transporteurs de type NaPi vis-à-vis du transport et de la cytotoxicité de l'uranium.

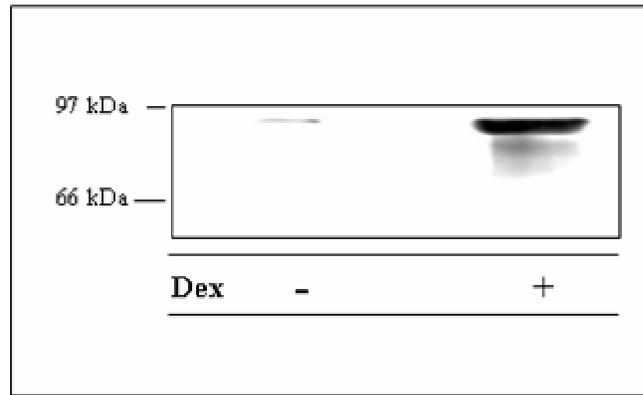
### VI.1/ Validation du modèle MDCK transfecté

La première partie de notre étude a consisté à vérifier la validité du modèle MDCK transfecté. Pour cela, les cellules ont été pré-traitées pendant 16 heures dans un milieu d'incubation auquel nous avons ajouté soit 1  $\mu\text{mol/l}$  de dexaméthasone, afin de stimuler le promoteur du gène *rNaPi-2*, soit un volume équivalent du « solvant » dans lequel la dexaméthasone avait été préparée.

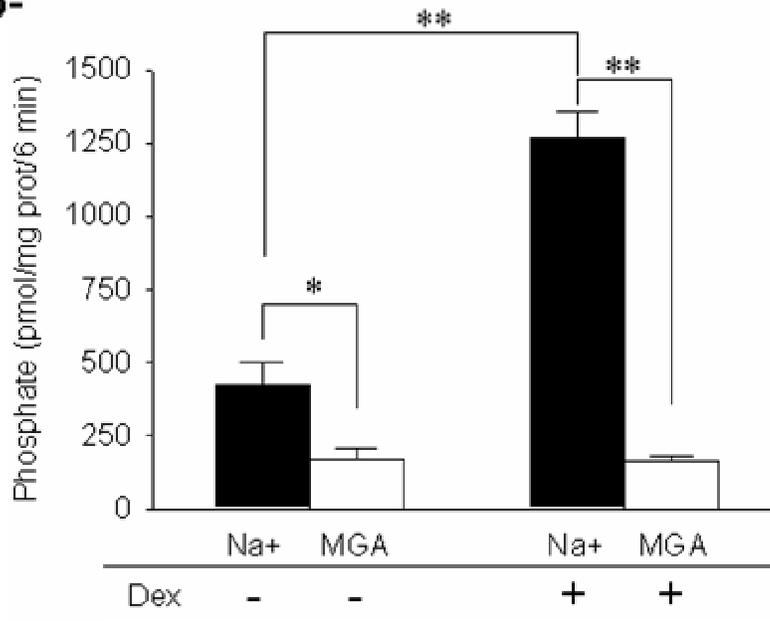
La **figure 41a** présente un des immunoblots rNaPi-2 montrant l'effet de l'activation du promoteur du gène pendant 16 heures. Lorsque les cellules MDCK sont traitées par la dexaméthasone, on observe l'apparition d'une bande à environ 90-95 kDa qui correspondrait à la forme glycosylée du co-transporteur rNaPi-2.

Cette protéine n'étant pratiquement pas détectée en absence de dexaméthasone, nous avons alors évalué l'effet de son expression sur le taux de transport sodium-dépendant du phosphate (**figure 41b**). Dans le modèle cellulaire non stimulé, l'activité de transport sur un période de 6 minutes est de  $427.5 \pm 77.5$  et de  $170.2 \pm 36.9$  pmoles par mg de protéines totales respectivement en présence ou en absence de sodium. Le transport sodium-dépendant basal est donc de l'ordre 257 pmoles par mg de protéine. En revanche, lorsque le promoteur du gène *rNaPi-2* est stimulé par la dexaméthasone, le taux de transport total et le taux de transport sodium-indépendant du phosphate sont respectivement de  $1268.4 \pm 91.3$  et  $163.2 \pm 20.9$  pmoles par mg de protéines. Le transport sodium-dépendant de cet élément étant de 1105.2 pmoles par mg de protéine dans ce dernier cas, cela revient à dire

**-a-**



**-b-**



**Figure 41** : Validation du modèle MDCK transfecté avec l'ADNc codant pour le co-transporteur NaPi IIa.

(a) Caractérisation du co-transporteur rNaPi-2 par western blot. (b) Détermination de l'activité de transport sodium-dépendant du phosphate. Les cellules MDCK ont été pré-traitées pendant 16 heures soit avec 1  $\mu\text{mol/l}$  de dexaméthasone (Dex), soit avec un volume équivalent du solvant qui a servi à préparer la solution de dexaméthasone. Dans le cadre des études de transport, ces dernières ont été effectuées soit en présence de sodium, soit de *N*-méthyl-*D*-glucamine (MGA)

que l'activation de l'expression de *rNaPi-2* s'accompagne d'une stimulation d'environ un facteur 4 du transport de type NaPi.

Par la suite, lorsqu'il sera fait référence au modèle MDCK dont le promoteur du gène codant pour *rNaPi-2* n'aura pas été activé, nous le noterons *rNaPi<sup>-</sup>* ou MDCK(-). Réciproquement, lorsqu'il sera fait référence au modèle MDCK dont le promoteur du gène aura été préalablement activé, nous le noterons *rNaPi-2<sup>+</sup>* ou MDCK(+).

## VI.2/ *rNaPi-2* et cytotoxicité de l'uranium

En considérant l'hypothèse d'origine selon laquelle la fraction cytotoxique de l'uranium serait transportée sous la forme d'un complexe uranyle-phosphate par l'intermédiaire d'un co-transporteur de type NaPi, l'activation du gène *rNaPi-2* devrait alors être associée à une potentialisation de l'effet cytotoxique de l'actinide. Cette dernière devrait, elle-même, être proportionnelle à la concentration en phosphate. Nous avons donc réalisé une étude de cytotoxicité en se plaçant dans quatre conditions expérimentales :

- Dans le modèle MDCK(-) en présence d'une concentration physiologique en phosphate de 1 mmol/l,
- Dans le modèle MDCK(-) en présence d'une concentration en phosphate de 0.1 mmol/l,
- Dans le modèle MDCK(+) en présence d'une concentration physiologique en phosphate de 1 mmol/l,
- Et enfin, dans le modèle MDCK(+) en présence d'une concentration en phosphate de 0.1 mmol/l.

Comme le montre la **figure 42a**, lorsque la concentration en phosphate est de 1 mmol/l, tandis que la cytotoxicité n'est détectée qu'à partir d'une concentration en uranium de 0.8 mmol/l dans le système *rNaPi<sup>-</sup>*, elle apparaît beaucoup plus précocement dans le modèle *rNaPi<sup>+</sup>*. Dans ce dernier cas, la cytotoxicité est observable pour une concentration en uranium de 0.3 mmol/l. Il est intéressant de noter que, de manière similaire à l'effet stimulateur du taux de transport du phosphate, la stimulation du gène *rNaPi-2* par la dexaméthasone génère une

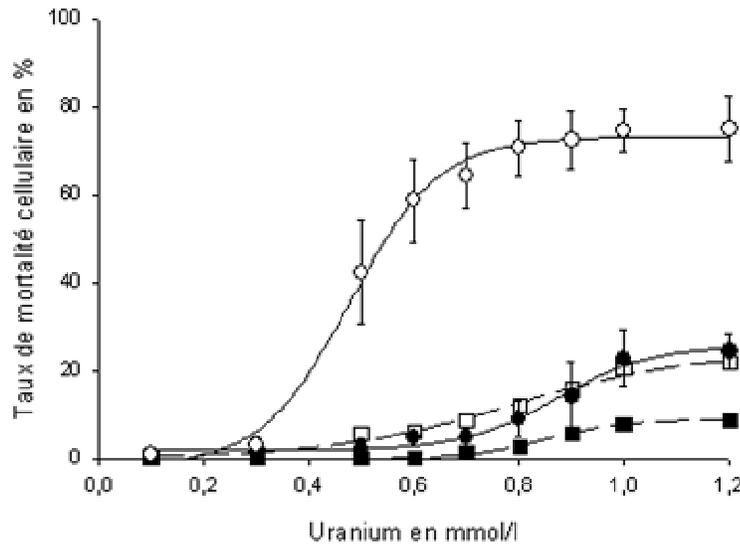
potentialisation d'un facteur d'environ 3.5 de la cytotoxicité maximale de l'actinide. Celle-ci est atteinte pour une concentration en uranium de 1 et de 0.8 mmol/l, respectivement pour le modèle rNaPi<sup>-</sup> et rNaPi<sup>+</sup>. De manière surprenante, le plateau de toxicité dans le modèle MDCK(+) est de  $75.2 \pm 7.2\%$  et non de 100%. Ce résultat suggère donc que l'on a atteint soit une saturation du mécanisme de transport de l'uranium, soit une saturation du processus cytotoxique, lorsque la concentration de l'actinide est supérieure à 0.8 mmol/l.

Enfin, lorsque les études sont conduites dans un milieu d'incubation carencé en phosphate (0.1 mmol/l), la stimulation de la cytotoxicité de l'uranium par l'activation du gène *rNaPi-2* est totalement supprimée. Dans ce cas, le profil de toxicité est superposable à celui que nous avons précédemment obtenu pour une concentration physiologique en phosphate avec le modèle rNaPi<sup>-</sup>. Cette réduction de cytotoxicité est également observable lorsque ces études sont réalisées avec le système rNaPi-2<sup>-</sup>. Il apparaît ainsi, qu'indépendamment du taux d'expression de rNaPi-2, la diminution de la concentration en phosphate provoque une réduction de la cytotoxicité maximale de l'actinide d'environ un facteur 3.

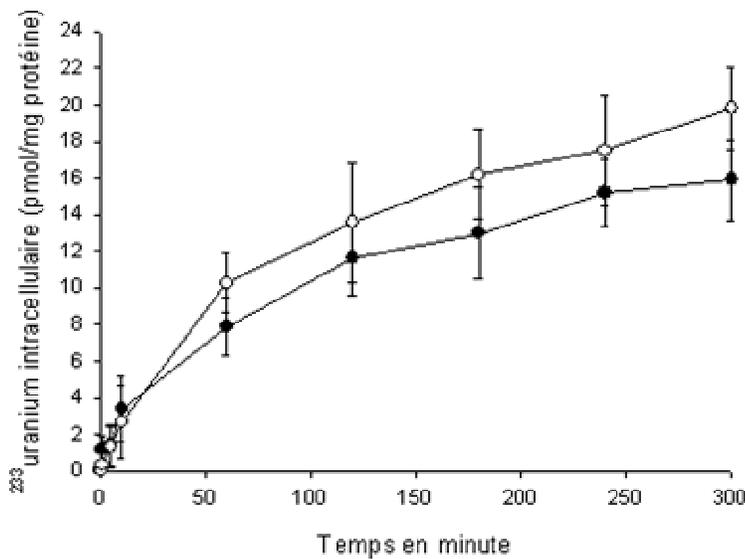
### **VI.3/ rNaPi-2 et absorption de l'uranium**

Puisque la sur-expression de rNaPi-2 engendre une potentialisation de la cytotoxicité de l'uranium, nous avons vérifié si cette dernière pouvait être associée à une élévation du taux de transport de l'actinide. Nous avons ainsi réalisé une étude cinétique d'accumulation de l'uranium sur une période d'incubation de 300 minutes, simultanément dans les modèles cellulaires MDCK(-) et MDCK(+). Comme l'illustre la **figure 42b**, la quantité totale d'uranium assimilé croît linéairement pendant les 60 premières minutes et semble atteindre un équilibre d'absorption au-delà de la 240<sup>ème</sup> minute. L'absorption de l'uranium par les cellules MDCK est cependant indépendante du taux d'expression du co-transporteur rNaPi-2, celle-ci étant respectivement de  $15.9 \pm 2.4$  et  $18.7 \pm 1.5$  pmoles par mg de protéines à 300 minutes dans les modèles MDCK(-) et MDCK(+).

-a-



-b-



**Figure 42 : Rôle du co-transporteur NaPi-2 dans l'absorption et la cytotoxicité de l'uranium.**

Les études ont été réalisées avec le modèle cellulaire MDCK, transfecté avec l'ADNc codant pour le co-transporteur rNaPi-2, soit avant (●, ■), soit après (○, □) expression du co-transporteur (-a-) Courbe de cytotoxicité représentant le taux de mortalité cellulaire en fonction de la concentration en uranium à 24 heures. (-b-) Cinétique de l'absorption de 1 μmol/l d'uranium <sup>233</sup> par les cellules.

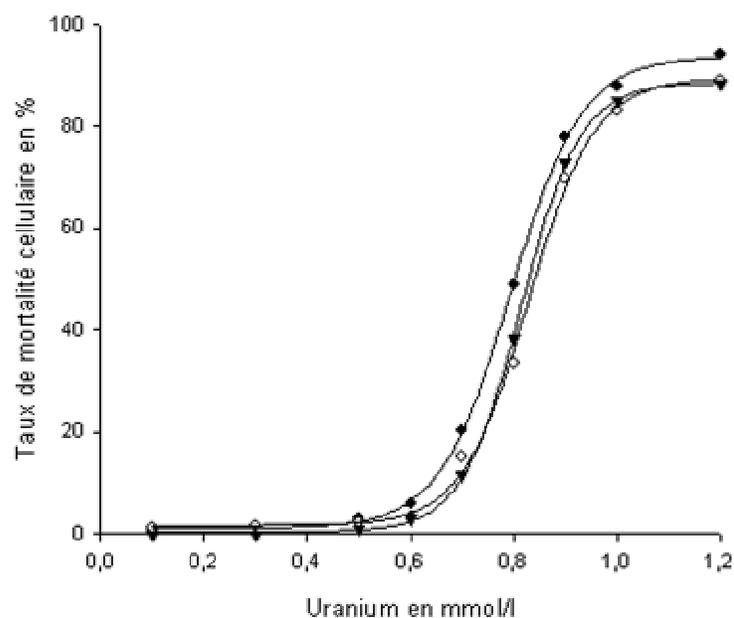
## VII/ Discussion

Ce travail permet de mettre en évidence l'existence d'une relation très étroite entre le processus de transport du phosphate et la cytotoxicité engendrée par l'uranium. Nous avons en effet constaté au cours de cette étude que l'intensité de la toxicité de l'actinide peut être directement corrélée à l'activité de transport du phosphate dans les cellules LLC-PK<sub>1</sub>. Le traitement des cellules par la colchicine, la cytochalasine D, le PMA, ou encore la concanavaline A génère simultanément une stimulation du co-transporteur de type NaPi et une potentialisation de l'effet cytotoxique de l'uranium. Par la suite, nous avons démontré que l'inhibition du co-transporteur NaPi s'accompagne également d'une réduction significative et dose-dépendante de la toxicité de l'actinide. D'autre part, puisque le taux de mortalité cellulaire induit par l'uranium est multiplié par un facteur de 3.3 lorsque le co-transporteur rNaPi-2 est sur-exprimé dans la lignée cellulaire MDCK, laquelle est très peu sensible à l'actinide à l'état basal, **nous suggérons par conséquent que la fraction cytotoxique de l'uranium est absorbée par les cellules *via* les systèmes de transport sodium-dépendant du phosphate.**

De manière intéressante, les cellules LLC-PK<sub>1</sub> n'expriment pas le récepteur PTH/PTHrP de l'hormone parathyroïdienne (Malmstrong et Murer, 1986) qui est pourtant le facteur hormonal majeur de régulation de la réabsorption tubulaire proximale du phosphate *in vivo* (pour revue : Murer, 2000). Dans ces cellules, Bringham *et al* ont alors cloné l'ADNc codant pour un isoforme du récepteur PTH/PTHrP, et l'étude de la transduction du signal après stimulation de ces récepteurs par un analogue tronqué de l'hormone, la PTH(1-34), montre que cette dernière est couplée à une activation dose-dépendante de l'accumulation intracellulaire en AMPc et en calcium (Bringham *et al*, 1993). Cependant, bien que l'asymétrie signalétique semble être rétablie lorsque le récepteur est exprimé dans cette lignée cellulaire, celui-ci ayant été localisé par immunohistochimie aux pôles apical et basolatéral des cellules (Hayes *et al*, 1995), son activation par l'hormone parathyroïdienne induit une stimulation du co-transport NaPi indépendamment du taux d'activation de la voie AC/AMPc/PKA (Guo *et al*, 1995). Il a ainsi été démontré que l'activation de la protéine kinase C est capable de mimer l'effet de l'hormone parathyroïdienne, et que l'administration d'AMPc n'a aucun effet sur le taux de

transport du phosphate. La **figure 43** montre que le traitement des cellules LLC-PK<sub>1</sub> avec l'AMPc ne modifie pas la cytotoxicité de l'uranium. Cette dernière est donc entièrement indépendante du taux d'activation de la voie signalétique AC/AMPc/PKA, et conforte l'hypothèse selon laquelle la fraction cytotoxique de l'uranium serait transportée par l'intermédiaire du co-transport sodium-dépendant du phosphate.

Il faut également noter que la réduction de la cytotoxicité de l'actinide n'est généralement pas associée à une inhibition de son transport. Par exemple, tandis que la substitution du sodium par le MGA ou le traitement des cellules avec 0.1 et 1 mmol/l de PFA diminuent fortement la cytotoxicité de l'uranium, ces conditions expérimentales ne réduisent cependant pas le taux d'absorption de l'actinide. Le fait que le taux de transport de l'uranium soit cependant fortement réduit en présence d'une concentration de 10 mmol/l de PFA provient probablement des caractéristiques physico-chimiques de cette molécule. En effet, tel que l'éthane-1-hydroxy-1,1-biphosphonate (EHBP), qui est capable de se complexer à l'uranium et de réduire sa toxicité *in vivo* (Ubios *et al*, 1994 ; Hengé-Napoli *et al*, 1999 ; Martinez *et al*, 2000), comme son nom l'indique la structure du PFA est également composée d'une fonction phosphonate. Le PFA est par conséquent susceptible de complexer l'uranium en solution et de réduire par la même son absorption et son effet toxique. On peut donc suggérer, que pour une concentration en PFA de 10 mmol/l, la bio-disponibilité de l'uranium dans le milieu d'incubation est fortement réduite et donc que l'inhibition de transport de l'uranium est un effet non-spécifique à cette concentration. Ainsi, puisque la cytotoxicité de l'uranium peut être modifiée indépendamment de son taux d'absorption, l'hypothèse selon laquelle l'uranium serait absorbé par l'intermédiaire de deux mécanismes de transport semble être encore vérifiée ici. D'après l'ensemble de nos travaux, le premier correspondrait ainsi à un processus endocytique, qui véhiculerait la majeure partie de l'uranium, et le second serait le processus de transport sodium-dépendant du phosphate. Le fait que la quantité totale d'uranium absorbée soit indépendante du taux d'expression du co-transporteur rNaPi-2 dans le modèle cellulaire MDCK conforte encore davantage cette hypothèse.



**Figure 43 :** Effet de la stimulation de PKA par l'AMPc sur la cytotoxicité de l'uranium.

La taux de cytotoxicité de l'uranium a été mesuré au bout de 24 heures après traitement des cellules LLC-PK<sub>1</sub> avec 0 mmol/l (●), 0.1 mmol/l (○) ou 1 mmol/l (▼) d'AMPc, un activateur de PKA

Enfin, puisque la cytotoxicité de l'uranium est directement proportionnelle à la charge extracellulaire en phosphate et inversement proportionnelle à la concentration en calcium, et qu'une modification de la concentration de ces deux ions dans le milieu d'incubation s'accompagne principalement d'une redistribution théorique des complexes de type uranyle-phosphate, il est fortement probable que l'un de ces complexes corresponde à l'espèce chimique de l'uranium qui serait transportée *via* le co-transporteur de type NaPi. Or, sachant que le phosphate est réabsorbé au niveau des cellules tubulaires proximales sous ses formes mono- ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) et notamment divalentes ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ), **nous suggérons que l'espèce uranifère qui serait absorbée par ce processus serait le complexe  $\text{UO}_2(\text{PO}_4)^-$ .**

## **DISCUSSION GENERALE, PERSPECTIVES ET**

### **CONCLUSION**

Les conséquences histologiques et pathologiques associées à la chimio-toxicité tubulaire proximale de l'uranium sont aujourd'hui bien définies et parfaitement caractérisées. En revanche, bien que ces dernières relèvent d'une atteinte toxique cellulaire, les mécanismes de transport du milieu extracellulaire vers le compartiment intra-cytoplasmique n'ont fait l'objet d'aucune étude expérimentale. De même, les processus cellulaires impliqués dans le développement de la toxicité de l'uranium n'ont été que de très peu étudiés. Il s'agit principalement des travaux de Brady (1989), Mizuno (1997), Sano (1998 et 2000) et Miller (2001), lesquels seront discutés par la suite. Cependant, bien que ces études aient permis d'identifier certains déterminants moléculaires impliqués dans la toxicité cellulaire de l'uranium, aucune d'entre elles ne permet de définir avec précision le(s) moyen(s) par lequel (lesquels) l'actinide est réabsorbé au niveau de la surface apicale des cellules tubulaires proximales, et d'établir l'origine des lésions cellulaires induites par cet élément.

Le tubule proximal, lieu de dépôt et de toxicité de l'uranium, joue un rôle crucial dans les phénomènes de réabsorption des électrolytes contenus dans l'urine primitive et d'excrétion des substances toxiques pour l'organisme et des déchets issus des bio-transformations cellulaires. A ce niveau, il existe en effet une grande diversité de transporteurs localisés au pôle apical des cellules dont l'implication dans ces processus est aujourd'hui bien connue. Or, ces systèmes de transport représentent également « des porte d'entrée » potentielles pour les substances néphrotoxiques. Par exemple, il a été démontré que le cadmium est en partie réabsorbé via un échangeur d'anions inorganiques localisé sur la face apicale des cellules tubulaires proximales (Endo, 2002), et que le mercure est réabsorbé sous la forme d'un complexe dicystéinylmercure via les co-transporteurs sodium-dépendants et -indépendants de la cystéine (pour revue : Zalups, 2000). Qu'en est-il donc du (des) mécanisme(s) de réabsorption et de toxicité de l'uranium ?

Le travail que nous avons réalisé nous permet aujourd'hui de proposer un modèle de toxicité cellulaire pour l'uranium. Ce modèle, développé à la suite de nos travaux, intègre à la fois les résultats précédemment acquis *in vivo* et *in vitro* concernant la toxico-cinétique de l'actinide, nos résultats obtenus par l'intermédiaire d'un modèle d'étude *in vitro*, mais aussi des incertitudes qui peuvent subsister à ce jour.

## **II/ L'endocytose clathrine-dépendante : mécanisme principal de l'absorption et de l'accumulation de l'uranium**

L'une des observations précoces liée à la toxicité chimique rénale induite par l'uranium, qui peut être effectuée par microscopie électronique à transmission, est la présence et l'accumulation de micro-cristaux de phosphate d'uranyle au sein des lysosomes cellulaires (Galle, 1974 ; Mirto *et al*, 1999). Ce phénomène d'accumulation intra-lysosomale, associé selon Galle à un processus de détoxication de l'organisme mis en œuvre par les cellules, a ainsi conduit à l'hypothèse que l'endocytose serait probablement le processus par lequel l'uranium serait réabsorbé *in vivo* au niveau du segment tubulaire proximal du néphron. Or, bien que cette hypothèse semblait être jusqu'à ce jour la plus vraisemblable, il n'existait cependant aucune étude susceptible de confirmer cette théorie. Nos travaux constituent ainsi la première preuve expérimentale validant ce concept. En effet, de manière similaire à l'endocytose clathrine-dépendante de l'albumine-fitc, nous avons démontré que l'absorption de l'uranium par les cellules LLC-PK<sub>1</sub> est :

- un processus actif, puisqu'elle est inhibée lorsque les études de transport sont conduites à 4°C,
- dépendante de l'état du réseau filamentueux d'actine et du réseau microtubulaire, tous deux impliqués dans le transport intracellulaire des vésicules d'endocytose,
- inhibée lorsque l'activité de PKC, une sérine/thréonine kinase, est activée,
- également réduite par des substances connues pour bloquer l'élaboration de la charpente de clathrine et la formation des vésicules d'endocytose (chlorpromazine et sucrose),
- stimulée par la concanavaline A,

- et enfin, insensible à la phalloïdine, un stabilisateur du cytosquelette d'actine.

En dehors de ces observations, l'absorption de l'uranium par les cellules LLC-PK<sub>1</sub> n'est pas altérée par le traitement avec la filipine, un inhibiteur de l'endocytose cavéoline-dépendante. Nous suggérons donc que **le mécanisme principal du transport de l'uranium est un processus endocytique clathrine-dépendant, lequel**, serait ainsi responsable de l'accumulation de l'actinide sous la forme de micro-précipités de phosphate d'uranyle insolubles au sein des lysosomes.

Afin de compléter notre étude sur le rôle de l'endocytose dans l'accumulation et la toxicité de l'uranium, il serait aujourd'hui intéressant d'étudier l'effet de la transfection et de l'expression dans les cellules LLC-PK<sub>1</sub> d'un mutant de dynamine, la dynamine dynK44A, incapable d'hydrolyser le GTP en GDP + Pi (Damke *et al*, 1994). La dynamine, qui est recrutée sous sa forme phosphorylée et liée au GTP (Owen *et al*, 1998) au niveau des zones de formation des vésicules d'endocytose tapissées de clathrine, est en effet un facteur enzymatique clé qui intervient lors de l'étape du bourgeonnement vésiculaire, et dont l'hydrolyse du GTP provoque la constriction des invaginations membranaires. Ainsi, par l'intermédiaire d'une transfection cellulaire avec l'ADNc codant pour le mutant de dynamine, il serait possible d'évaluer spécifiquement l'impact de la suppression du processus endocytique clathrine-dépendant sur l'absorption de l'uranium, le transport du phosphate et la cytotoxicité générée par l'actinide. Cette étude permettrait de supprimer les biais expérimentaux pouvant être liés à l'utilisation de substances exogènes telles que la colchicine et la cytochalasine D qui sont également connues pour altérer de nombreux systèmes membranaires de transport, autres que l'endocytose.

## **II/ Les co-transporteurs de type NaPi**

### **II.1/ Transport de la fraction cytotoxique de l'uranium**

Tandis que l'inhibition de l'endocytose clathrine-dépendante engendre une réduction significative de l'absorption d'uranium, de manière surprenante, nous avons également constaté que celle-ci s'accompagne d'une potentialisation de l'effet

cytotoxique de l'actinide. Ces observations nous ont alors conduit à l'hypothèse de l'existence au niveau membranaire d'un second système de transport, dont l'activité est en partie régulée par l'endocytose, et qui serait responsable de l'absorption de la fraction cytotoxique de l'uranium. L'observation que les reins et les os soient les deux organes majeurs de dépôt de l'uranium, et qu'il ait été démontré que cet élément soit capable de provoquer une altération du taux d'expression de l'oncogène RAS au sein des cellules de type ostéoblastique (Miller *et al*, 2001), nous a suggéré l'existence d'un système de transport commun qui serait à la fois exprimé au niveau des ostéoblastes et des cellules appartenant à l'épithélium tubulaire proximal.

Or, l'une des fonctions physiologiques communes entre les os et les reins concerne le contrôle et le maintien du calcium et du phosphate sanguins. Cette fonction est entretenue à la fois au niveau rénal par une régulation très fine du taux de réabsorption du phosphate et du calcium, et au niveau osseux par une modification des activités ostéoblastique et ostéoclastique, respectivement responsable de la synthèse et de la dégradation de la matrice minérale osseuse : l'hydroxyapatite. Le processus de réabsorption du calcium étant paracellulaire, passif et secondaire à la réabsorption de l'eau et du sodium au niveau tubulaire proximal, ce processus ne peut pas être à l'origine de la toxicité de l'uranium. En revanche, puisque la réabsorption tubulaire proximale du phosphate est un processus actif secondaire qui s'effectue par l'intermédiaire du co-transporteur NaPi de type IIa, et que le transport du phosphate au niveau des ostéoblastes est réalisé *via* un co-transporteur NaPi de type III, nous avons suggéré que l'absorption de la fraction cytotoxique de l'uranium pouvait être associée à l'activité de ces co-transporteurs. **C'est ainsi que nous avons démontré, à partir de cette hypothèse, l'existence d'une parfaite corrélation entre le taux d'activité du co-transport sodium-dépendant du phosphate et de la cytotoxicité induite par l'uranium.**

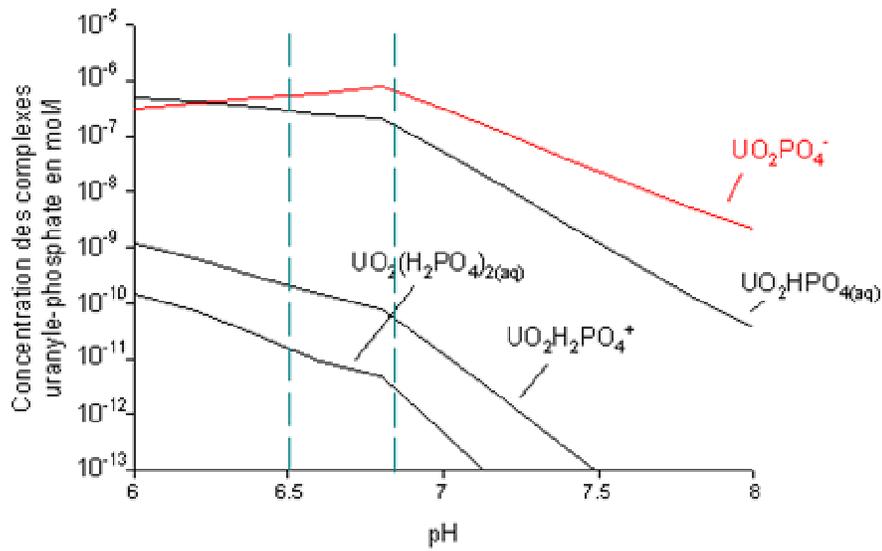
Comme nous avons également pu le constater, la cytotoxicité de l'uranium est directement proportionnelle à la concentration extracellulaire en phosphate et inversement proportionnelle à la charge en calcium. Dans les deux cas, la potentialisation de la cytotoxicité est corrélée avec une élévation des complexes uranyle-phosphate  $UO_2PO_4^-$  et  $UO_2(HPO_4)$ , mise en évidence lors de l'étude théorique de répartition des espèces chimiques de l'uranium. Cela suggère que l'une

de ces deux espèces est probablement le complexe qui est absorbé *via* les co-transporteurs NaPi, et qui est donc à l'origine de la cytotoxicité de l'uranium. Or, puisque le co-transporteur rénal NaPi-IIa transporte le phosphate uniquement sous ses formes mono- et divalentes,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  et  $\text{HPO}_4^{2-}$ , et que le complexe uranyle-phosphate existe majoritairement sous **la forme  $\text{UO}_2\text{PO}_4^-$**  aux valeurs de pH comprises entre 7.4 et 6.5 (**figure 44**) qui correspondent aux pH rencontrés en amont et en aval du tubule proximal, nous suggérons que cette espèce chimique **est la forme sous laquelle l'actinide est transporté *via* les co-transporteurs de type NaPi.**

Cela pourrait d'autre part expliquer la raison pour laquelle, *in vivo*, les lésions histologiques induites par l'uranium prennent naissance au niveau de la pars recta (segment S3) avant de s'étendre de part et d'autre du tubule proximal. En effet, puisque les pKa de l'acide phosphorique sont respectivement de 2.15, 7.2 et 12 pour les formes phosphate  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  et  $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ , et que le co-transporteur NaPi IIa est plus affiné pour la forme divalente, le phosphate est ainsi essentiellement réabsorbé *in vivo* au niveau des segments S1 et S2 du tubule proximal sous sa forme divalente  $\text{HPO}_4^{2-}$ , où la valeur du pH est proche du pH physiologique (7.4). En revanche, puisqu'on le retrouve préférentiellement sous sa forme  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  au niveau de la pars recta, où le pH est compris entre 6.5 et 6.8, il est majoritairement réabsorbé à ce niveau sous sa forme monovalente. Il est ainsi probable que **le complexe  $\text{UO}_2\text{PO}_4^-$ , qui correspondrait à la fraction cytotoxique de l'uranium, soit principalement réabsorbé au niveau du segment S3 du tubule proximal par compétition d'homologie de structure avec  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ .**

## II.2/ Système de transport secondaire de l'uranium

Un troisième volet important qui concerne la toxico-cinétique de l'uranium, révèle des informations que nous avons pu obtenir à partir de la comparaison des données cytotoxiques et des résultats concernant le transport de l'uranium. Nous avons démontré, d'une part, que l'inhibition spécifique du co-transport de type NaPi s'accompagne d'une réduction significative de la cytotoxicité, mais pas de l'absorption de l'uranium. D'autre part, bien que la cytotoxicité de l'uranium à 24 heures ne soit observable que pour des concentrations en actinide de l'ordre du millimolaire (0.5 à 0.6 mmol/l), la caractérisation des paramètres cinétiques de



**Figure 44** : Diagramme de répartition des principales espèces chimiques de type uranyle-phosphate en fonction du pH du milieu.

Les conditions expérimentales qui ont été choisies sont les suivantes  
[U] = 1 mmol/l ; [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>] = 33.4 mmol/l , [Na<sup>+</sup>] = 145 mmol/l ; [K<sup>+</sup>] = 5.3 mmol/l ,  
[Cl<sup>-</sup>] = 126 mmol/l ; [NO<sub>3</sub><sup>-</sup>] = 2.31 μmol/l ; [SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>] = 0.811 mmol/l ;  
[Mg<sup>2+</sup>] = 0.811 mmol/l , pH = 7.2 ; température = 37°C , [Ca<sup>2+</sup>] = 2.39 mmol/l  
et [Pi] = 1 mmol/l.

l'absorption de l'actinide montre l'existence d'un système de transport saturable pour des concentrations de l'ordre du micromolaire ( $V_{max} = 16.95 \pm 0.92$  pmoles par mg de protéines totales et  $K_d = 1.105 \pm 0.175$   $\mu\text{mol/l}$ ). Enfin, tandis que la sur-expression du co-transporteur rNaPi-2 dans le modèle cellulaire MDCK transfecté s'accompagne d'une potentialisation de l'effet cytotoxique de l'uranium, son taux de transport n'est cependant pas significativement différent par comparaison avec celui qui est déterminé dans le modèle MDCK(-) où le co-transporteur rNaPi-2 n'est pas exprimé. Ces observations suggèrent donc que **les co-transporteurs de type NaPi ne sont à l'origine de l'absorption que d'une petite fraction d'uranium.**

### III/ Effet de la concanavoline A

La concanavoline A est une des substances que nous avons testées et dont l'effet sur l'endocytose de l'albumine-fitc, sur le transport du phosphate et de l'uranium, ainsi que sur la cytotoxicité engendrée par l'actinide mérite une attention particulière. En effet, contrairement à l'ensemble des molécules que nous avons utilisées lors de notre étude, il se dégage deux faits essentiels :

- la concanavoline A est la seule substance qui provoque une stimulation de l'endocytose clathrine-dépendante,
- cependant, en tenant compte de cet effet de potentialisation d'endocytose, il était alors logique de penser que la concanavoline A induirait une inhibition du transport sodium-dépendant du phosphate. Il apparaît au contraire que la concanavoline A est également un activateur du co-transporteur de type NaPi.

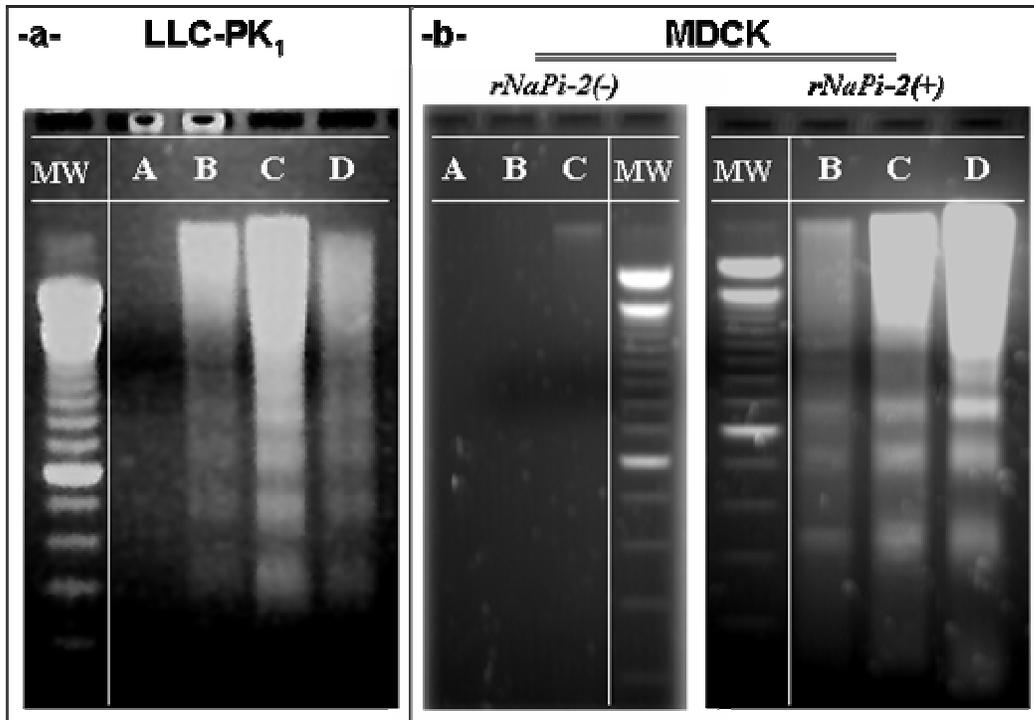
Bien que cet effet soit quelque peu surprenant, le fait que la stimulation de l'endocytose par la concanavoline A s'accompagne d'une stimulation du taux de transport de l'uranium, et réciproquement, que l'activation du co-transporteur de type NaPi soit associée à une potentialisation de la cytotoxicité de l'actinide, confirme les résultats obtenus avec les autres substances, notamment si l'on tient compte des résultats obtenus par Brunskill (1998) et Pfister (1999). En effet, bien que le processus d'endocytose des co-transporteurs appartenant à la sous-famille NaPi-IIa soit un mécanisme clathrine-dépendant (Traebert *et al*, 2000), il a été démontré que ces derniers empruntent une voie intracellulaire différente de celle de l'albumine. Au

cours de ces études, conduites sur la lignée cellulaire OK, il a notamment été montré que l'inhibition de la phosphatidylinositol 3-kinase, une enzyme impliquée dans de nombreux processus d'orientation des molécules endocytées dans le compartiment intra-cytoplasmique, provoque une réduction de l'endocytose de l'albumine (Brunskill *et al*, 1998) sans pour autant altérer l'endocytose du co-transporteur de type NaPi (Pfister *et al*, 1999). **Ces observations mettent en évidence que des substances telle que la concanavaline A sont capables de stimuler (ou d'inhiber) simultanément le processus endocytique de l'albumine tout en stimulant (ou inhibant) l'activité des co-transporteurs NaPi, ces derniers n'empruntant pas la même voie endocytique que celle de l'albumine. Ainsi, l'effet de la concanavaline A confirme donc que la cytotoxicité induite par l'uranium est consécutive à l'absorption d'une fraction de l'actinide par les co-transporteurs de la famille NaPi.**

#### **IV/ Mort cellulaire induite par l'uranium**

Une des conséquences de l'intoxication des cellules LLC-PK<sub>1</sub> par l'uranium est l'induction d'apoptose (figure 45a). Cette dernière, qui peut être évaluée par la méthode de l'échelle d'ADN, est directement couplée à l'activité des co-transporteurs de type NaPi, comme nous avons pu le démontrer à l'aide de la lignée cellulaire MDCK transfectée avec le gène codant pour rNaPi-2 (figure 45b). *In vitro*, la cytotoxicité induite par l'uranium relève ainsi de l'activation d'un processus apoptotique. Ces observations confirment les résultats obtenus par Muzino et par Sano. Le premier a démontré qu'une intoxication cellulaire par l'uranium pouvait être à l'origine d'une stimulation du taux d'expression de HSP73 (Mizuno *et al*, 1997), un facteur anti-apoptotique (Lin *et al*, 2000), responsable de l'acquisition par les cellules rénales d'une résistance vis-à-vis de la toxicité de l'uranium. Le second a récemment montré que la mort cellulaire engendrée à la suite de l'induction d'une insuffisance rénale aiguë par l'uranium chez le rat est en partie la conséquence d'une apoptose (Sano *et al*, 1998, 2000).

Ce phénomène n'est cependant pas spécifique à l'uranium, puisqu'il peut être déclenché par d'autres métaux tels que le cadmium (Ishido *et al*, 1998) et le mercure (Duncan-Achanzar *et al*, 1996). Concernant le cadmium, il a ainsi été démontré que



**Figure 45** : Rôle des co-transporteurs de type NaPi dans l'induction du processus apoptotique par l'uranium. Les cellules LLC-PK<sub>1</sub> (**a**) et MDCK (**b**) ont été incubées pendant 16 heures (**B**) ou 24 heures (**A**, **C** et **D**) en présence (**B** et **C**) ou en absence (**A**) de 0.8 mmol/l d'uranium, ou encore en présence de 1 μmol/l de *cis*-platine pendant 24 heures (**D** : **contrôle positif**). L'ADN des cellules a ensuite été extrait, purifié, puis déposé sur gel d'agarose. L'apparition « d'échelle » d'ADN est caractéristique de l'apoptose. MW = marqueurs moléculaires.

l'induction de l'apoptose par cet élément est en partie consécutive à l'activation de la caspase-9 (Kondoh *et al*, 2002) à la suite d'une lésion mitochondriale et du re-largage dans le milieu intra-cytoplasmique de Cytochrome c (Kondoh *et al*, 2001). Or, les études de Brady ont préalablement montré que l'uranium est capable de provoquer une altération progressive et sélective de l'activité respiratoire mitochondriale (Brady *et al*, 1989). Il est donc possible que la toxicité de l'uranium prenne naissance à ce niveau en engendrant l'activation de la caspase-9. Il serait donc intéressant de vérifier la validité de cette hypothèse, puis de caractériser plus en détail la voie intracellulaire impliquée dans la toxicité de l'uranium. Cela permettrait alors de déterminer des cibles thérapeutiques potentielles dans le but de contrecarrer les effets d'une intoxication sévère. Selon cette stratégie, puisqu'il a été démontré que le cadmium génère également l'apparition de radicaux libres dans les cellules hépatocytaires de truite (Risso-de Faverney *et al*, 2001), et qu'une étude postgénomique actuellement en cours au laboratoire d'étude appliquée en radiotoxicologie tend à montrer que l'uranium stimule l'expression de transcrits impliqués dans les processus de réponse au stress oxydatif, l'origine de l'atteinte toxique mitochondriale de l'uranium pourrait alors être consécutive à la formation d'espèce oxygénées réactives.

## **VI/ Validation des résultats obtenus sur la lignée cellulaire LLC-PK<sub>1</sub>**

Il serait intéressant d'effectuer le même type d'approche que nous avons entrepris sur un second modèle d'étude : la lignée cellulaire OK, également d'origine tubulaire proximale. En effet, bien que la lignée cellulaire LLC-PK<sub>1</sub> possède un système intrinsèque de transport sodium-dépendant du phosphate (Rabito, 1983 ; Biber *et al*, 1983 ; Brown *et al*, 1984), ce dernier n'est cependant pas caractérisé d'un point de vue biochimique et sa régulation est physiologiquement distincte de celle du co-transporteur rénal NaPi-IIa. En premier lieu, les cellules LLC-PK<sub>1</sub> n'expriment pas les récepteurs de l'hormone parathyroïdienne qui est pourtant le facteur hormonal majeur de rétro-régulation négative de la réabsorption du phosphate *in vivo*. Ensuite, comme nous avons pu le constater précédemment, contrairement au processus tubulaire proximal, l'activité de transport du phosphate dans ces cellules est indépendante du taux d'activation de la voie signalétique intracellulaire AC/AMPc/PKA. En revanche, les cellules appartenant à la lignée

cellulaire OK expriment un co-transporteur de type NaPi IIa : le co-transporteur NaPi-4. Ce dernier répond à tous les critères biochimiques, physiologiques et fonctionnels qui sont décrits *in vivo*. Ainsi, l'utilisation de ces cellules dans le cadre de l'étude de la toxicité de l'uranium permettrait de confirmer les résultats que nous avons obtenus.

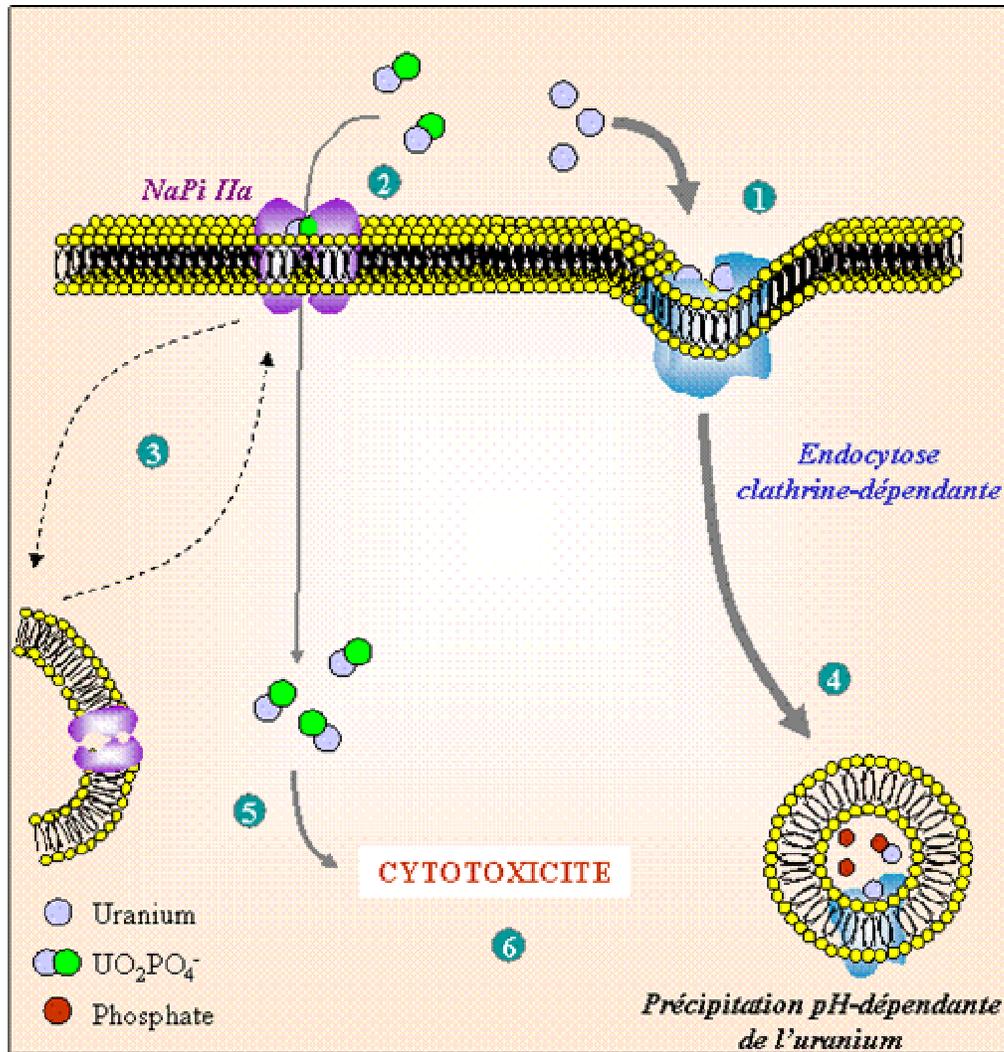
D'autre part, bien que les lignées cellulaires soient des outils de choix utilisés en toxicologie rénale afin de déterminer et de caractériser les processus impliqués dans le transport et la toxicité des agents néphrotoxiques, il s'agit néanmoins de modèles d'étude réductionnistes qui ne prennent pas en compte la complexité structurale et fonctionnelle de l'organisme. La prochaine étape de ce travail pourrait donc être la validation de nos travaux par une approche expérimentale *in vivo*. Il serait ainsi envisageable d'induire chez le rat une hypophosphatémie aiguë, soit par l'administration répétitive d'hormone parathyroïdienne, soit par l'intermédiaire d'une alimentation carencée en phosphate, puis d'évaluer l'impact de cette hypophosphatémie sur le dépôt et la toxicité rénale de l'uranium. De manière équivalente, il serait également intéressant de regarder l'effet de l'administration de colchicine et de cytochalasine D sur l'expression apicale du co-transporteur NaPi IIa par immunohistochimie, sur son activité de transport et enfin de comparer ces résultats avec l'amplitude de la toxicité induite par l'uranium.

Récemment, Beck a mis en place un modèle d'étude de souris transgénique, knock-out pour le gène codant pour le co-transporteur NaPi-IIa, c'est-à-dire un modèle animal où l'expression de ce co-transporteur est totalement abolie (Beck *et al*, 1998). Chez les souris knock-out (*Npt2(-/-)*), la réabsorption tubulaire proximale du phosphate est augmentée et associée à une hypophosphatémie chronique (Beck *et al*, 1998 ; Zhao et Tenenhouse, 2000). La mise en place d'un protocole expérimental concernant l'étude biocinétique et toxicologique de l'uranium à partir de ce modèle serait ainsi un moyen supplémentaire pour confirmer et valider *in vivo* l'hypothèse selon laquelle la fraction toxique de l'uranium est réabsorbée par l'intermédiaire du co-transporteur NaPi-IIa.

## VI/ Conclusion

La compilation des informations concernant la répartition histologique de l'uranium, ses caractéristiques cytotoxiques et cinétiques, permet aujourd'hui de mieux comprendre le comportement chimiotoxique de cet élément. Ainsi, à partir des résultats que nous avons obtenus par l'intermédiaire d'une approche expérimentale *in vitro* réalisée à l'aide de la lignée cellulaire LLC-PK1, d'origine tubulaire proximale, et des données de la littérature, nous proposons un modèle probable de toxicité *in vivo* pour l'uranium qui peut être schématisé selon la **figure 46**.

D'après ce modèle, nous suggérons que la majeure partie de l'uranium qui est réabsorbé au niveau tubulaire proximal l'est par un processus endocytique clathrine-dépendant, et qu'une fraction très faible l'est également par l'intermédiaire du co-transporteur Na-Pi de type IIa. Le premier processus serait alors à l'origine de l'accumulation de l'uranium au sein des lysosomes sous une forme de micro-cristaux insolubles de phosphate d'uranyle, et le second serait responsable de la translocation d'une fraction soluble de l'actinide dans le compartiment intracytoplasmique. Ainsi, contrairement à l'uranium qui serait absorbé par endocytose puis stocké au sein des lysosomes, l'uranium absorbé par l'intermédiaire du co-transporteur NaPi IIa serait à l'origine d'une perturbation du métabolisme cellulaire pouvant évoluer vers la mort des cellules.



**Figure 46 : Modèle d'absorption et de toxicité de l'uranium *in vivo* par extrapolation.** D'après les résultats de cytotoxicité et de transport obtenus *in vitro*, nous suggérons que l'uranium est absorbé par l'intermédiaire de 2 mécanismes : le premier étant un processus Endocytaire clathrine-dépendant (1), et le second étant le co-transporteur NaPi IIa, responsable de la réabsorption tubulaire proximale du phosphate (2). L'activité de ce dernier est, en partie, régulée par les processus endo- et exocytiques (3). L'endocytose constituerait la voie principale de la réabsorption de l'uranium et serait à l'origine de son transfert vers les lysosomes, au niveau desquels il précipiterait sous la forme de microcristaux de phosphate d'uranyle de manière pH-dépendante (4). En revanche, le co-transporteur NaPi IIa permettrait la translocation d'une petite fraction d'uranium de la lumière tubulaire vers le compartiment cytoplasmique sous la forme UO<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> par compétition d'homologie structurale avec H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> (5). Une fois introduite dans le cytosol, ce serait cette fraction qui serait responsable de la cytotoxicité de l'uranium (6).

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Représentation schématique des chaînes de désintégration radioactive des isotopes naturels de l'uranium : $^{234}\text{U}$ , $^{235}\text{U}$ , $^{238}\text{U}$ .-----	<b>19</b>
<b>Figure 2</b> : Fraction des aérosols déposés dans les différentes région de l'arbre respiratoire en fonction du diamètre aérodynamique moyen des particules (CIPR, 1994).-----	<b>23</b>
<b>Figure 3</b> : Modèle biocinétique de l'uranium (CIPR, 1995).-----	<b>27</b>
<b>Figure 4</b> : Anatomie du rein.-----	<b>36</b>
<b>Figure 5</b> : Vascularisation du rein.-----	<b>39</b>
<b>Figure 6</b> : Structure fonctionnelle du néphron.-----	<b>40</b>
<b>Figure 7</b> : Le corpuscule rénal ou de Malpighi.-----	<b>42</b>
<b>Figure 8</b> : Podocyte (a), barrière de filtration capillaire (b) et fente de filtration (c).-----	<b>43</b>
<b>Figure 9</b> : Schéma de l'aspect en microscopie électronique de l'épithélium du tubule rénal.-----	<b>45</b>
<b>Figure 10</b> : Cinétique d'apparition des principales altérations morphologiques et fonctionnelles après l'administration par voie parentérale de nitrate d'uranyle chez le rat.-----	<b>50</b>
<b>Figure 11</b> : Site principal de l'atteinte toxique rénale induite par l'uranium.-----	<b>51</b>
<b>Figure 12</b> : Image obtenue par microscopie électronique à balayage (MEB) de la surface luminale du glomérule.-----	<b>54</b>
<b>Figure 13</b> : Représentation schématique des deux modes de mort cellulaire : la nécrose (a) et l'apoptose (b).-----	<b>62</b>
<b>Figure 14</b> : Voie de signalisation intracellulaire impliquées dans le déclenchement de l'apoptose.-----	<b>62</b>
<b>Figure 15</b> : Modèles de toxicité cellulaire induite par l'uranium.-----	<b>66</b>
<b>Figure 16</b> : La clathrine et la cage de clathrine.-----	<b>70</b>
<b>Figure 17</b> : L'endocytose clathrine-dépendante.-----	<b>74</b>
<b>Figure 18</b> : Représentation schématique du mécanisme d'acidification vésiculaire et endosomal.-----	<b>79</b>
<b>Figure 19</b> : La famille des protéines de type NaPi.-----	<b>88</b>
<b>Figure 20</b> : modèle cinétique du système NaPi IIa.-----	<b>101</b>

---

<b>Figure 21</b> : Rôle des processus endo- et exocytiques dans le contrôle de l'activité NaPi IIa.-----	<b>102</b>
<b>Figure 22</b> : Mécanisme d'inactivation du transport de Pi par la PTH.-----	<b>107</b>
<b>Figure 23</b> : Principe du test de cytotoxicité par la mesure de l'activité de la LDH.-----	<b>117</b>
<b>Figure 24</b> : Etablissement des profils de toxicité des substances connues pour altérer l'endocytose clathrine-dépendante.-----	<b>126</b>
<b>Figure 25</b> : Clichés de microscopie électronique à transmission et analyse de la composition des inclusions par diffraction aux rayons X.-----	<b>130</b>
<b>Figure 26</b> : Fonction lysosomale de stockage et de dégradation des particules endocytées.-----	<b>131</b>
<b>Figure 27</b> : Caractéristiques fonctionnelles de l'endocytose de l'albumine-fitc dans la lignée cellulaire LLC-PK <sub>1</sub> .-----	<b>133</b>
<b>Figure 28</b> : Paramètres cinétiques de l'absorption de l'uranium par les cellules LLC-PK <sub>1</sub> .-----	<b>135</b>
<b>Figure 29</b> : Détermination de l'effet de certains agents pharmacologiques sur l'endocytose de l'albumine-fitc.-----	<b>139</b>
<b>Figure 30</b> : Endocytose et absorption de l'uranium par les cellules LLC-PK <sub>1</sub> .--	<b>142</b>
<b>Figure 31</b> : Cytotoxicité de l'uranium.-----	<b>144</b>
<b>Figure 32</b> : Endocytose et cytotoxicité induite par l'uranium.-----	<b>146</b>
<b>Figure 33</b> : Rôle de la PKC dans la cytotoxicité de l'uranium.-----	<b>148</b>
<b>Figure 34</b> : Transport et toxicité de l'uranium.-----	<b>151</b>
<b>Figure 35</b> : Rôle du phosphate et du calcium vis-à-vis de la toxicité de l'uranium.-----	<b>156</b>
<b>Figure 36</b> : Diagrammes de spéciation de deux solutions d'uranium en fonction de la concentration en phosphate (a) et de la concentration en calcium (b) dans le milieu d'incubation.-----	<b>158</b>
<b>Figure 37</b> : Modification de l'activité du co-transporteur NaPi dans les Cellules LLC-PK <sub>1</sub> .-----	<b>160</b>
<b>Figure 38</b> : Méthodologie expérimentale de l'inhibition du transport du phosphate.-----	<b>162</b>
<b>Figure 39</b> : Inhibition compétitive du co-transporteur NaPi, transport et cytotoxicité de l'uranium.-----	<b>164</b>
<b>Figure 40</b> : Inhibition du co-transport NaPi par suppression du gradient	

électrochimique sodique.-----	166
<b>Figure 41</b> : Validation du modèle MDCK transfecté avec l'ADNc codant pour le co-transporteur NaPi IIa.-----	168
<b>Figure 42</b> : Rôle du co-transporteur rNaPi-2 dans l'absorption et la cytotoxicité de l'uranium.-----	171
<b>Figure 43</b> : Effet de la stimulation de PKA par l'AMPc sur la cytotoxicité de l'uranium.-----	174
<b>Figure 44</b> : Diagramme de répartition des principales espèces chimiques de type uranyle-phosphate en fonction du pH du milieu.-----	181
<b>Figure 45</b> : Rôle des co-transporteurs de type NaPi dans l'induction du processus apoptotique par l'uranium.-----	184
<b>Figure 46</b> : Modèle d'absorption et de toxicité de l'uranium <i>in vivo</i> par extrapolation.-- -----	188

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I</b> : Teneur isotopique de l'uranium naturel et principales caractéristiques des isotopes.-----	<b>19</b>
<b>Tableau II</b> : Valeurs de références des taux de clairance représentant le transport des particules inhalées entre les différentes régions de l'arbre respiratoire en fonction du temps.-----	<b>23</b>
<b>Tableau III</b> : Liste de la composition lipidique et protéique des caveolae.-----	<b>84</b>
<b>Tableau IV</b> : Caractéristiques structurales et fonctionnelles des 3 membres de la famille des co-transporteurs NaPi.-----	<b>89</b>
<b>Tableau V</b> : Régulation hormonale et non-hormonale de la réabsorption tubulaire du Pi.-----	<b>99</b>
<b>Tableau VI</b> : Caractéristiques fonctionnelles des cellules LLC-PK <sub>1</sub> .-----	<b>112</b>
<b>Tableau VII</b> : Tableau récapitulatif des concentrations non-toxiques et des concentrations qui ont été sélectionnées pour notre étude.-----	<b>127</b>
<b>Tableau VIII</b> : Modification de l'activité du co-transporteur NaPi dans les cellules LLC-PK <sub>1</sub> .-----	<b>160</b>

## REFERENCES

### -A-

Aballay, A.; Stahl, P. D.; Mayorga, L. S. Phorbol Ester Promotes Endocytosis by Activating a Factor Involved in Endosome Fusion. *J. Cell Science* **1999**, *112*, 2549-2557.

Ahloulay, M.; Dechaux, M.; Hassler, C.; Bouby, N.; Bankir, L. Cyclic AMP Is a Hepatorenal Link Influencing Natriuresis and Contributing to Glucagon-Induced Hyperfiltration in Rats. *J. Clin. Invest* **1996**, *98*, 2251-2258.

Al Mahrouq, H. A.; Kempson, S. A. Photoaffinity Labeling of Brush-Border Membrane Proteins Which Bind Phosphonoformic Acid. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 1422-1427.

Allon, M.; Rodriguez, M.; Llach, F. Insulin in the Acute Renal Adaptation to Dietary Phosphate Restriction in the Rat. *Kidney Int.* **1990**, *37*, 14-20.

Allon, M.; Hruska, K. A. Renal Adaptation to Dietary Phosphate Restriction in Rats. Interactions With Insulin and Calcitriol. *Diabetes* **1991**, *40*, 1134-1140.

Alnemri, E. S.; Livingston, D. J.; Nicholson, D. W.; Salvesen, G.; Thornberry, N. A.; Wong, W. W.; Yuan, J. Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *Cell* **1996**, *87*, 171.

Amiel, C.; Kuntziger, H.; Richet, G. Micropuncture Study of Handling of Phosphate by Proximal and Distal Nephron in Normal and Parathyroidectomized Rat. Evidence for Distal Reabsorption. *Pflugers Arch.* **1970**, *317*, 93-109.

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*, F705-F710.

Anderson, H. A.; Chen, Y.; Norkin, L. C. Bound Simian Virus 40 Translocates to Caveolin-Enriched Membrane Domains, and Its Entry Is Inhibited by Drugs That Selectively Disrupt Caveolae. *Mol. Biol. Cell* **1996**, *7*, 1825-1834.

Anderson, R. G.; Kamen, B. A.; Rothberg, K. G.; Lacey, S. W. Potocytosis: Sequestration and Transport of Small Molecules by Caveolae. *Science* **1992**, *255*, 410-411.

Anderson, R. G. Caveolae: Where Incoming and Outgoing Messengers Meet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1993**, *90*, 10909-10913.

Anderson, R. G. The Caveolae Membrane System. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 199-225.

Andrews, P. M.; Bates, S. B. Effects of Dietary Protein on Uranyl-Nitrate-Induced Acute Renal Failure. *Nephron* **1987**, *45*, 296-301.

Aniento, F.; Emans, N.; Griffiths, G.; Gruenberg, J. Cytoplasmic Dynein-Dependent Vesicular Transport From Early to Late Endosomes. *J. Cell Biol.* **1993**, *123*, 1373-1387.

Aniento, F.; Gu, F.; Parton, R. G.; Gruenberg, J. An Endosomal Beta COP Is Involved in the PH-Dependent Formation of Transport Vesicles Destined for Late Endosomes. *J. Cell Biol.* **1996**, *133*, 29-41.

Anthony, M. L.; Gartland, K. P.; Beddell, C. R.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K. Studies of the Biochemical Toxicology of Uranyl Nitrate in the Rat. *Arch. Toxicol.* **1994**, *68*, 43-53.

Arai, H.; Berne, M.; Terres, G.; Terres, H.; Puopolo, K.; Forgac, M. Subunit Composition and ATP Site Labeling of the Coated Vesicle Proton- Translocating Adenosinetriphosphatase. *Biochemistry* **1987**, 6632-6638.

Artalejo, C. R.; Lemmon, M. A.; Schlessinger, J.; Palfrey, H. C. Specific Role for the PH Domain of Dynamin-1 in the Regulation of Rapid Endocytosis in Adrenal Chromaffin Cells. *EMBO J.* **1997**, *16*, 1565-1574.

Ausiello, D. A.; Hall, D. H.; Dayer, J. M. Modulation of Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase by Vasopressin and Calcitonin in Cultured Porcine Renal LLC-PK1 Cells. *Biochem. J.* **1980**, *186*, 773-780.

Ausiello, D. A.; Skorecki, K. L.; Verkman, A. S.; Bonventre, J. V. Vasopressin Signaling in Kidney Cells. *Kidney Int.* **1987**, *31*, 521-529.

Avasthi, P. S.; Evan, A. P.; Hay, D. Glomerular Endothelial Cells in Uranyl Nitrate-Induced Acute Renal Failure in Rats. *J. Clin. Invest* **1980**, *65*, 121-127.

**-B-**

Barac-Nieto, M.; Gupta, R. K.; Spitzer, A. NMR Studies of Phosphate Metabolism in the Isolated Perfused Kidney of Developing Rats. *Pediatr. Nephrol.* **1990**, *4*, 392-398.

Barac-Nieto, M.; Alfred, M.; Spitzer, A. Phosphate Depletion in Opossum Kidney Cells: Apical but Not Basolateral or Transepithelial Adaptions of Pi Transport. *Exp. Nephrol.* **2001**, *9*, 258-264.

Barnett T.B. and Metcalf R.G. Pathological anatomy following uranium poisoning. In : Pharmacology and toxicology of uranium compounds. National Nuclear Energy Series. Div. VI, Vol I, Parts I. New York : McGraw-Hill, **1949**, 207-235.

Barouch, W.; Prasad, K.; Greene, L.; Eisenberg, E. Auxilin-Induced Interaction of the Molecular Chaperone Hsc70 With Clathrin Baskets. *Biochemistry* **1997**, *36*, 4303-4308.

Barrett, P. Q.; Aronson, P. S. Glucose and Alanine Inhibition of Phosphate Transport in Renal Microvillus Membrane Vesicles. *Am. J. Physiol* **1982**, *242*, F126-F131.

Barrouillet, M. P.; Ohayon-Court; Dubus, I.; L'Azou, B.; Nguyen, B. C. Influence of Cadmium Speciation for the Evaluation of in Vitro Cadmium Toxicity on LLC-PK(1) Cells. *Toxicol. In Vitro* **2001**, *15*, 525-529.

Basset S.H., Frenkel A., Cedars N., Van Alisine H., Waterhouse C., Cusson K. The excretion of hexavalent uranium following intravenous administration. Part II. Studies on Human Subjects. Rochester, New York : University of Rochester, **1948**, 1-57.

Beck, L.; Karaplis, A. C.; Amizuka, N.; Hewson, A. S.; Ozawa, H.; Tenenhouse, H. S. Targeted Inactivation of Npt2 in Mice Leads to Severe Renal Phosphate Wasting, Hypercalciuria, and Skeletal Abnormalities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1998**, *95*, 5372-5377.

Beere, H. M.; Wolf, B. B.; Cain, K.; Mosser, D. D.; Mahboubi, A.; Kuwana, T.; Tailor, P.; Morimoto, R. I.; Cohen, G. M.; Green, D. R. Heat-Shock Protein 70 Inhibits Apoptosis by Preventing Recruitment of Procaspase-9 to the Apaf-1 Apoptosome. *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 469-475.

Behar, S. M.; Corbet, S.; Diamond, B.; Scharff, M. D. The Molecular Origin of Anti-DNA Antibodies. *Int. Rev. Immunol.* **1989**, *5*, 23-42.

Beliveau, R.; Strevey, J. Phosphate Transport in Kidneys: Effect of Transmembrane Electrical Potential. *Am. J. Physiol* **1991**, *261*, F663-F669.

Benjamin, I. J.; McMillan, D. R. Stress (Heat Shock) Proteins: Molecular Chaperones in Cardiovascular Biology and Disease.

Berard P; Quesne B; Auriol B; Chalabreysse J. Cutaneous contamination after uranyl nitrate skin burd: incident report. *Radiat.Prot.Dosimetry.* *53*, 269-272. 1994.  
Ref Type: Generic

Berlin M. Rudell B. Uranium. In : Friberg L. eds. Handbook on the toxicology of metals. *Elsevier/North Molland Biochemical Press* **1979**, 647-658.

Bernard S.R., Muir J.R., Royster J. W. The distribution and excretion of uranium in man. In : Proceeding of the Health Physics Society. *First Annual Meeting*, **1957**, 35-48.

Bernard S.R. et Struxness E.G. A study of the distribution and excretion of uranium in man. Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN, ORNL-2304. **1957**.

Berry, J. P.; Hourdry, J.; Galle, P.; Lagrue, G. Chromium Concentration by Proximal Renal Tubule Cells: an Ultrastructural, Microanalytical and Cytochemical Study. *J. Histochem. Cytochem.* **1978**, *26*, 651-657.

Berry, J. P.; Zhang, L.; Galle, P. Interaction of Selenium With Copper, Silver, and Gold Salts. Electron Microprobe Study. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **1995**, *27*, 21-28.

Berthiaume, E. P.; Medina, C.; Swanson, J. A. Molecular Size-Fractionation During Endocytosis in Macrophages. *J. Cell Biol.* **1995**, *129*, 989-998.

Biber, J.; Brown, C. D.; Murer, H. Sodium-Dependent Transport of Phosphate in LLC-PK1 Cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, *735*, 325-330.

Biber, J.; Murer, H. Na-Pi Cotransport in LLC-PK1 Cells: Fast Adaptive Response to Pi Deprivation. *Am. J. Physiol* **1985**, *249*, C430-C434.

Biber, J.; Forgo, J.; Murer, H. Modulation of Na<sup>+</sup>-Pi Cotransport in Opossum Kidney Cells by Extracellular Phosphate. *Am. J. Physiol* **1988**, *255*, C155-C161.

Biber, J.; Custer, M.; Werner, A.; Kaissling, B.; Murer, H. Localization of NaPi-1, a Na/Pi Cotransporter, in Rabbit Kidney Proximal Tubules. II. Localization by Immunohistochemistry. *Pflugers Arch.* **1993**, *424*, 210-215.

Biber, J.; Caderas, G.; Stange, G.; Werner, A.; Murer, H. Effect of Low-Phosphate Diet on Sodium/Phosphate Cotransport mRNA and Protein Content and on Oocyte Expression of Phosphate Transport. *Pediatr. Nephrol.* **1993**, *7*, 823-826.

Biwersi, J.; Emans, N.; Verkman, A. S. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Activation Stimulates Endosome Fusion in Vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1996**, *93*, 12484-12489.

Blantz, R. C. The Mechanism of Acute Renal Failure After Uranyl Nitrate. *J. Clin. Invest* **1975**, *55*, 621-635.

Blantz, R. C.; Pelayo, J. C.; Gushwa, L. C.; Myers, R. R.; Evan, A. P. Functional Basis for the Glomerular Alterations in Uranyl Nitrate Acute Renal Failure. *Kidney Int.* **1985**, *28*, 733-743.

Bohrer, M. P.; Baylis, C.; Robertson, C. R.; Brenner, B. M.; Troy, J. L.; Willis, W. T. Mechanisms of the Puromycin-Induced Defects in the Transglomerular Passage of Water and Macromolecules. *J. Clin. Invest* **1977**, *60*, 152-161.

Boileau L.J.R., Nieboer E., Richardson D.H.S. Uranium accumulation in the lichen *Cladonia rangiferina*. Part II. Toxic effects of cationic, neutral, and anionic forms of the uranyl ion. *Can. J. Bot.* **1985**, *63*, 390-397.

Bondy, G. S.; Armstrong, C. L. Cytotoxicity of Nephrotoxic Fungal Toxins to Kidney-Derived LLC-PK1 and OK Cell Lines. *Cell Biol. Toxicol.* **1998**, *14*, 323-332.

Bonjour, J. P.; Caverzasio, J. Phosphate Transport in the Kidney. *Rev. Physiol Biochem. Pharmacol.* **1984**, *100*, 161-214.

Bosshard E.; Zimmerli B.; Schlatter C. Uranium in the diet: risk assessment of its nephro- and radiotoxicity. *Chemosphere* **24**(3), 309-321. 1992.

Ref Type: Generic

Bowman, E. J.; Siebers, A.; Altendorf, K. Bafilomycins: a Class of Inhibitors of Membrane ATPases From Microorganisms, Animal Cells, and Plant Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1988**, *85*, 7972-7976.

Boyer, C. J.; Xiao, Y.; Dugre, A.; Vincent, E.; Delisle, M. C.; Beliveau, R. Phosphate Deprivation Induces Overexpression of Two Proteins Related to the Rat Renal Phosphate Cotransporter NaPi-2. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1281*, 117-123.

Bradbury, N. A.; Jilling, T.; Kirk, K. L.; Bridges, R. J. Regulated Endocytosis in a Chloride Secretory Epithelial Cell Line. *Am. J. Physiol* **1992**, *262*, C752-C759.

Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.

Brady, H. R.; Kone, B. C.; Brenner, R. M.; Gullans, S. R. Early Effects of Uranyl Nitrate on Respiration and K<sup>+</sup> Transport in Rabbit Proximal Tubule. **1989**.

Bretscher, A. Purification of an 80,000-Dalton Protein That Is a Component of the Isolated Microvillus Cytoskeleton, and Its Localization in Nonmuscle Cells. *J. Cell Biol.* **1983**, *97*, 425-432.

Broer, S.; Schuster, A.; Wagner, C. A.; Broer, A.; Forster, I.; Biber, J.; Murer, H.; Werner, A.; Lang, F.; Busch, A. E. Chloride Conductance and Pi Transport Are Separate Functions Induced by the Expression of NaPi-1 in Xenopus Oocytes. *J. Membr. Biol.* **1998**, *164*, 71-77.

Brown, C. D.; Murer, H. Characterization of a Na : K : 2Cl Cotransport System in the Apical Membrane of a Renal Epithelial Cell Line (LLC-PK1). *J. Membr. Biol.* **1985**, *87*, 131-139.

Brown D.P., Bloon T. Mortality among uranium enrichment workers. Report National Institute for Occupational Safety and Health. Cincinnati, OH. NTIS RB **1987**, 87-188.

Brown, E. M.; Pollak, M.; Hebert, S. C. The Extracellular Calcium-Sensing Receptor: Its Role in Health and Disease. *Annu. Rev. Med.* **1998**, *49*, 15-29.

Brunskill, N. J.; Stuart, J.; Tobin, A. B.; Walls, J.; Nahorski, S. Receptor-Mediated Endocytosis of Albumin by Kidney Proximal Tubule Cells Is Regulated by Phosphatidylinositide 3-Kinase.

Brunskill, N. J.; Nahorski, S.; Walls, J. Characteristics of Albumin Binding to Opossum Kidney Cells and Identification of Potential Receptors. *Pflugers Arch.* **1997**, *433*, 497-504.

Buchet, J. P.; Roels, H.; Bernard, A.; Lauwerys, R. Assessment of Renal Function of Workers Exposed to Inorganic Lead, Calcium or Mercury Vapor. *J. Occup. Med.* **1980**, *22*, 741-750.

Bulger, R. E. Renal Damage Caused by Heavy Metals. *Toxicol. Pathol.* **1986**, *14*, 58-65.

Bull R.J. Lead and energy metabolism. In : Singhal R.L., Thomas J.A., eds. Lead Toxicity. Baltimore : Urban and Schwarzeberg, **1980**, 119-168.

Bulman, R. A. Uranium Uptake into the Rat Liver: Effect of Thioacetamide and Lipophilic Glycerophosphate Upon Hepatic Uptake. *Int. J. Nucl. Med. Biol.* **1980**, *7*, 295-298.

Burckhardt, G.; Stern, H.; Murer, H. The Influence of PH on Phosphate Transport into Rat Renal Brush Border Membrane Vesicles. *Pflugers Arch.* **1981**, *390*, 191-197.

Busch, A.; Waldegger, S.; Herzer, T.; Biber, J.; Markovich, D.; Hayes, G.; Murer, H.; Lang, F. Electrophysiological Analysis of Na<sup>+</sup>/Pi Cotransport Mediated by a Transporter Cloned From Rat Kidney and Expressed in Xenopus Oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1994**, *91*, 8205-8208.

Busch, A. E.; Wagner, C. A.; Schuster, A.; Waldegger, S.; Biber, J.; Murer, H.; Lang, F. Properties of Electrogenic Pi Transport by a Human Renal Brush Border Na<sup>+</sup>/Pi Transporter. *J. Am. Soc. Nephrol.* **1995**, *6*, 1547-1551.

Busch, A. E.; Schuster, A.; Waldegger, S.; Wagner, C. A.; Zempel, G.; Broer, S.; Biber, J.; Murer, H.; Lang, F. Expression of a Renal Type I Sodium/Phosphate Transporter (NaPi-1) Induces a Conductance in Xenopus Oocytes Permeable for Organic and Inorganic Anions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1996**, *93*, 5347-5351.

Busch, A. E.; Biber, J.; Murer, H.; Lang, F. Electrophysiological Insights of Type I and II Na/Pi Transporters. *Kidney Int.* **1996**, *49*, 986-987.

-C-

Cantiello, H. F.; Scott, J. A.; Rabito, C. A. Polarized Distribution of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchange System in a Renal Cell Line (LLC-PK1) With Characteristics of Proximal Tubular Cells. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 3252-3258.

Caverzasio, J.; Bonjour, J. P. Mechanism of Rapid Phosphate (Pi) Transport Adaptation to a Single Low Pi Meal in Rat Renal Brush Border Membrane. *Pflugers Arch.* **1985**, *404*, 227-231.

Caverzasio, J.; Brown, C. D.; Biber, J.; Bonjour, J. P.; Murer, H. Adaptation of Phosphate Transport in Phosphate-Deprived LLC-PK1 Cells. *Am. J. Physiol* **1985**, *248*, F122-F127.

Ceresa, B. P.; Schmid, S. L. Regulation of Signal Transduction by Endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2000**, *12*, 204-210.

Cestra, G.; Castagnoli, L.; Dente, L.; Minenkova, O.; Petrelli, A.; Migone, N.; Hoffmuller, U.; Schneider-Mergener, J.; Cesareni, G. The SH3 Domains of Endophilin and Amphiphysin Bind to the Proline-Rich Region of Synaptojanin 1 at Distinct Sites That Display an Unconventional Binding Specificity. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 32001-32007.

Chabardes, D.; Imbert, M.; Clique, A.; Montegut, M.; Morel, F. PTH Sensitive Adenyl Cyclase Activity in Different Segments of the Rabbit Nephron. *Pflugers Arch.* **1975**, *354*, 229-239.

Chabardes, D.; Imbert-Teboul, M.; Montegut, M.; Clique, A.; Morel, F. Catecholamine Sensitive Adenylate Cyclase Activity in Different Segments of the Rabbit Nephron. *Pflugers Arch.* **1975**, *361*, 9-15.

Chabardes, D.; Gagnan-Brunette, M.; Imbert-Teboul, M.; Gontcharevskaia, O.; Montegut, M.; Clique, A.; Morel, F. Adenylate Cyclase Responsiveness to Hormones in Various Portions of the Human Nephron. *J. Clin. Invest* **1980**, *65*, 439-448.

Chalumeau, C.; du, C. D.; Defontaine, N.; Kellermann, O.; Paillard, M.; Poggioli, J. NHE3 Activity and Trafficking Depend on the State of Actin Organization in Proximal Tubule. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **2001**, *280*, F283-F290.

Chang, W. J.; Rothberg, K. G.; Kamen, B. A.; Anderson, R. G. Lowering the Cholesterol Content of MA104 Cells Inhibits Receptor-Mediated Transport of Folate. *J. Cell Biol.* **1992**, *118*, 63-69.

Chase, L. R.; Aurbach, G. D. Parathyroid Function and the Renal Excretion of 3'5'-Adenylic Acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1967**, *58*, 518-525.

Chassard-Bouchaud, C. [Uranium Concentration by Crustacea: A Structural, Ultrastructural and Microanalytical Study by Secondary Ion Emission and Electron Probe X Ray Microanalysis]. *C. R. Seances Acad. Sci. III* **1982**, *294*, 919-924.

Chassard-Bouchaud, C. [Role of Lysosomes and Spherocrystals in the Phenomenon of Uranium Concentration in the Mussel *Mytilus Edulis* (L). Microanalysis by X-Ray Spectrometry]. *C. R. Seances Acad. Sci. III* **1983**, *296*, 581-586.

Checkoway, H.; Pearce, N.; Crawford-Brown, D. J.; Cragle, D. L. Radiation Doses and Cause-Specific Mortality Among Workers at a Nuclear Materials Fabrication Plant. *Am. J. Epidemiol.* **1988**, *127*, 255-266.

Chen, M. S.; Obar, R. A.; Schroeder, C. C.; Austin, T. W.; Poodry, C. A.; Wadsworth, S. C.; Vallee, R. B. Multiple Forms of Dynamin Are Encoded by Shibire, a Drosophila Gene Involved in Endocytosis. *Nature* **1991**, *351*, 583-586.

Chevari, S.; Likhner, D. [Complex Formation of Natural Uranium in Blood]. *Med. Radiol. (Mosk)* **1968**, *13*, 53-57.

Choie D.D., Richter G.W. Effects of lead on the kidney. In : Singhal R.L., Thomas J.A., eds. Lead Toxicity. Baltimore : Urban and Schwarzeberg, **1980**, 187-212.

Chong, S. S.; Kristjansson, K.; Zoghbi, H. Y.; Hughes, M. R. Molecular Cloning of the cDNA Encoding a Human Renal Sodium Phosphate Transport Protein and Its Assignment to Chromosome 6p21.3-P23. *Genomics* **1993**, *18*, 355-359.

Chong, S. S.; Kozak, C. A.; Liu, L.; Kristjansson, K.; Dunn, S. T.; Bourdeau, J. E.; Hughes, M. R. Cloning, Genetic Mapping, and Expression Analysis of a Mouse Renal Sodium-Dependent Phosphate Cotransporter. *Am. J. Physiol* **1995**, *268*, F1038-F1045.

Chow, C. W.; Khurana, S.; Woodside, M.; Grinstein, S.; Orlowski, J. The Epithelial Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> Exchanger, NHE3, Is Internalized Through a Clathrin-Mediated Pathway. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 37551-37558.

Christensen, E. I.; Nielsen, S. Structural and Functional Features of Protein Handling in the Kidney Proximal Tubule. *Semin. Nephrol.* **1991**, *11*, 414-439.

Christensen, E. I.; Birn, H. Megalin and Cubilin: Synergistic Endocytic Receptors in Renal Proximal Tubule. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **2001**, *280*, F562-F573.

Christensen, E. I.; Birn, H. Megalin and Cubilin: Multifunctional Endocytic Receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 256-266.

Chuman, L.; Fine, L. G.; Cohen, A. H.; Saier, M. H., Jr. Continuous Growth of Proximal Tubular Kidney Epithelial Cells in Hormone-Supplemented Serum-Free Medium. *J. Cell Biol.* **1982**, *94*, 506-510.

Ciechanover, A. The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway. *Cell* **1994**, *79*, 13-21.

CIPR. Publication 66. Human respiratory tract : model for radiological protection : Part 3, ingestion doses coefficients. Pergamon Press, Oxford, Vol 24 n°1-3, **1994**.

CIPR. Publication 69. Age dependent doses to members of the public for intake of radionuclides : Part 3, ingestion doses coefficients. Pergamon Press, Oxford, Vol 25 n°1, **1995**.

CIPR Age-dependent doses to members of the public from intake of radionuclides : Part 4, inhalation dose coefficients. Radiation 71. Oxford : Pergamon Press, **1996**.

Cole, J. A.; Forte, L. R.; Eber, S.; Thorne, P. K.; Poelling, R. E. Regulation of Sodium-Dependent Phosphate Transport by Parathyroid Hormone in Opossum Kidney Cells: Adenosine 3',5'-Monophosphate- Dependent and -Independent Mechanisms.

Cole, J. A.; Eber, S. L.; Poelling, R. E.; Thorne, P. K.; Forte, L. R. A Dual Mechanism for Regulation of Kidney Phosphate Transport by Parathyroid Hormone. *Am. J. Physiol* **1987**, *253*, E221-E227.

Coles, H. S.; Burne, J. F.; Raff, M. C. Large-Scale Normal Cell Death in the Developing Rat Kidney and Its Reduction by Epidermal Growth Factor. *Development* **1993**, *118*, 777-784.

Collazo, R.; Fan, L.; Hu, M. C.; Zhao, H.; Wiederkehr, M. R.; Moe, O. W. Acute Regulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger NHE3 by Parathyroid Hormone Via NHE3 Phosphorylation and Dynamin-Dependent Endocytosis. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 31601-31608.

Collins, J. F.; Ghishan, F. K. Molecular Cloning, Functional Expression, Tissue Distribution, and in Situ Hybridization of the Renal Sodium Phosphate (Na<sup>+</sup>/P(i)) Transporter in the Control and Hypophosphatemic Mouse. *FASEB J.* **1994**, *8*, 862-868.

Conrad, P. A.; Smart, E. J.; Ying, Y. S.; Anderson, R. G.; Bloom, G. S. Caveolin Cycles Between Plasma Membrane Caveolae and the Golgi Complex by Microtubule-Dependent and Microtubule-Independent Steps. *J. Cell Biol.* **1995**, 1421-1433.

Cooper, J. R.; Stradling, G. N.; Smith, H.; Ham, S. E. The Behaviour of Uranium-233 Oxide and Uranyl-233 Nitrate in Rats. *Int. J. Radiat. Biol. Relat Stud. Phys. Chem. Med.* **1982**, *41*, 421-433.

Costa, E. M.; Feldman, D. Modulation of 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> Receptor Binding and Action by Sodium Butyrate in Cultured Pig Kidney Cells (LLC-PK1). *J. Bone Miner. Res.* **1987**, *2*, 151-159.

Cowart J.B.; Burnett W.C. The distribution of uranium and thorium decay-series radionuclides in the environment-A review. *J. Environ. Qual.* 23, 651-662. 1994.

Ref Type: Generic

Cremona, O.; Di Paolo, G.; Wenk, M. R.; Luthi, A.; Kim, W. T.; Takei, K.; Daniell, L.; Nemoto, Y.; Shears, S. B.; Flavell, R. A.; McCormick, D. A.; De Camilli, P. Essential Role of Phosphoinositide Metabolism in Synaptic Vesicle Recycling. *Cell* **1999**, 99, 179-188.

Cronin, R. E.; Brown, D. M.; Simonsen, R. Protection by Thyroxine in Nephrotoxic Acute Renal Failure. *Am. J. Physiol* **1986**, 251, F408-F416.

Cross-Mercer. Ultrastructure tissulaire et cellulaire. Approche fonctionnelle *Eds DeBoeck Université* **1995**.

Curtin, J. F.; Donovan, M.; Cotter, T. G. Regulation and Measurement of Oxidative Stress in Apoptosis. *J. Immunol. Methods* **2002**, 265, 49-72.

Custer, M.; Meier, F.; Schlatter, E.; Greger, R.; Garcia-Perez, A.; Biber, J.; Murer, H. Localization of NaPi-1, a Na-Pi Cotransporter, in Rabbit Kidney Proximal Tubules. I. MRNA Localization by Reverse Transcription/Polymerase Chain Reaction. *Pflugers Arch.* **1993**, 424, 203-209.

Custer, M.; Lotscher, M.; Biber, J.; Murer, H.; Kaissling, B. Expression of Na-P(i) Cotransport in Rat Kidney: Localization by RT-PCR and Immunohistochemistry. *Am. J. Physiol* **1994**, 266, F767-F774.

-D-

Dadoune J.P. Histologie. *Medecine Sciences Flammarion* **1990**.

Damke, H.; Baba, T.; Warnock, D. E.; Schmid, S. L. Induction of Mutant Dynamin Specifically Blocks Endocytic Coated Vesicle Formation. *J. Cell Biol.* **1994**, 127, 915-934.

Damke, H.; Baba, T.; van der Blik, A. M.; Schmid, S. L. Clathrin-Independent Pinocytosis Is Induced in Cells Overexpressing a Temperature-Sensitive Mutant of Dynamin. *J. Cell Biol.* **1995**, 131, 69-80.

Damon, E. G.; Eidson, A. F.; Hobbs, C. H.; Hahn, F. F. Effect of Acclimation to Caging on Nephrotoxic Response of Rats to Uranium. *Lab Anim Sci.* **1986**, 36, 24-27.

David, C.; McPherson, P. S.; Mundigl, O.; De Camilli, P. A Role of Amphiphysin in Synaptic Vesicle Endocytosis Suggested by Its Binding to Dynamin in Nerve Terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1996**, 93, 331-335.

de Arriba, G.; Barrio, V.; Olivera, A.; Rodriguez-Puyol, D.; Lopez-Novoa, J. M. Atrial Natriuretic Peptide Inhibits Angiotensin II-Induced Contraction of Isolated Glomeruli and Cultured Glomerular Mesangial Cells of Rats: the Role of Calcium. *J. Lab Clin. Med.* **1988**, *111*, 466-474.

de Heuvel, E.; Bell, A. W.; Ramjaun, A. R.; Wong, K.; Sossin, W. S.; McPherson, P. S. Identification of the Major Synaptotagmin-Binding Proteins in Brain. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 8710-8716.

Decorti, G.; Malusa, N.; Furlan, G.; Candussio, L.; Klugmann, F. B. Endocytosis of Gentamicin in a Proximal Tubular Renal Cell Line. *Life Sci.* **1999**, *65*, 1115-1124.

Delisle, M. C.; Boyer, C.; Vachon, V.; Giroux, S.; Beliveau, R. Immunodetection and Characterization of Proteins Implicated in Renal Sodium/Phosphate Cotransport. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1190*, 289-296.

Diaz, R.; Mayorga, L.; Stahl, P. In Vitro Fusion of Endosomes Following Receptor-Mediated Endocytosis. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 6093-6100.

Dorup, J.; Morsing, P.; Rasch, R. Tubule-Tubule and Tubule-Arteriole Contacts in Rat Kidney Distal Nephrons. A Morphologic Study Based on Computer-Assisted Three-Dimensional Reconstructions. *Lab Invest* **1992**, *67*, 761-769.

Dounce A.L., Roberts E., Wills J.M. Catalasuria as a sensitive test for uranium poisoning. In Voegtlin C., Hodge H.C., eds. Pharmacology and toxicology of uranium compounds. Vol I. Mc Graw-Hill, New York **1949**, 889-950.

Dousa, T. P.; Duarte, C. G.; Knox, F. G. Effect of Colchicine on Urinary Phosphate and Regulation by Parathyroid Hormone. *Am. J. Physiol* **1976**, *231*, 61-65.

Dousa, T. P. Modulation of Renal Na-Pi Cotransport by Hormones Acting Via Genomic Mechanism and by Metabolic Factors. *Kidney Int.* **1996**, *49*, 997-1004.

Dreyling, M. H.; Martinez-Climent, J. A.; Zheng, M.; Mao, J.; Rowley, J. D.; Bohlander, S. K. The T(10;11)(P13;Q14) in the U937 Cell Line Results in the Fusion of the AF10 Gene and CALM, Encoding a New Member of the AP-3 Clathrin Assembly Protein Family.

Duncan-Achanzar, K. B.; Jones, J. T.; Burke, M. F.; Carter, D. E.; Laird, H. E. Inorganic Mercury Chloride-Induced Apoptosis in the Cultured Porcine Renal Cell Line LLC-PK1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *277*, 1726-1732.

Dunn, K. W.; McGraw, T. E.; Maxfield, F. R. Iterative Fractionation of Recycling Receptors From Lysosomally Destined Ligands in an Early Sorting Endosome. *J. Cell Biol.* **1989**, *109*, 3303-3314.

Dupree, E. A.; Cragle, D. L.; McLain, R. W.; Crawford-Brown, D. J.; Teta, M. J. Mortality Among Workers at a Uranium Processing Facility, the Linde Air Products Company Ceramics Plant, 1943-1949. *Scand. J. Work Environ. Health* **1987**, *13*, 100-107.

Durbin P.W., Wrenn M.E. Metabolism and effects of uranium in animals. In : Conference on occupational health : Experience with uranium. Arlington, V.A., 28-30 April : ERDA **1975**, 93, 67-129.

Durbin P.W. Metabolic model for uranium. In : Biokinetics and analysis in man; United States Uranium Registry ; USUR 05, NEHF. Edited by R.H. Moore. **1984**, 47, F1-F65.

**-E-**

Elgavish, A.; Rifkind, J.; Sacktor, B. In Vitro Effects of Vitamin D3 on the Phospholipids of Isolated Renal Brush Border Membranes. *J. Membr. Biol.* **1983**, 72, 85-91.

Eliasson, L.; Renstrom, E.; Ammala, C.; Berggren, P. O.; Bertorello, A. M.; Bokvist, K.; Chibalin, A.; Deeney, J. T.; Flatt, P. R.; Gabel, J.; Gromada, J.; Larsson, O.; Lindstrom, P.; Rhodes, C. J.; Rorsman, P. PKC-Dependent Stimulation of Exocytosis by Sulfonylureas in Pancreatic Beta Cells. **1919**.

Elkjaer, M. L.; Birn, H.; Agre, P.; Christensen, E. I.; Nielsen, S. Effects of Microtubule Disruption on Endocytosis, Membrane Recycling and Polarized Distribution of Aquaporin-1 and Gp330 in Proximal Tubule Cells. *Eur. J. Cell Biol.* **1995**, 67, 57-72.

Ellender, M.; Haines, J. W.; Harrison, J. D. The Distribution and Retention of Plutonium, Americium and Uranium in CBA/H Mice. *Hum. Exp. Toxicol.* **1995**, 14, 38-48.

Ellender, M.; Harrison, J. D.; Pottinger, H.; Thomas, J. M. Induction of Osteosarcoma and Acute Myeloid Leukaemia in CBA/H Mice by the Alpha-Emitting Nuclides, Uranium-233, Plutonium-239 and Americium-241. *Int. J. Radiat. Biol.* **2001**, 77, 41-52.

Endo, T.; Kimura, O.; Sakata, M. Further Analysis of Cadmium Uptake From Apical Membrane of LLC-PK1 Cells Via Inorganic Anion Exchanger. *Pharmacol. Toxicol.* **1999**, 84, 187-192.

Endo, T. Transport of Cadmium Across the Apical Membrane of Epithelial Cell Lines. *Comp Biochem. Physiol C. Toxicol. Pharmacol.* **2002**, 131, 223-229.

Escoubet, B.; Djabali, K.; Amiel, C. Adaptation to Pi Deprivation of Cell Na-Dependent Pi Uptake: a Widespread Process. *Am. J. Physiol* **1989**, 256, C322-C328.

Evrin, P. E.; Wibell, L. The Serum Levels and Urinary Excretion of 2 -Microglobulin in Apparently Healthy Subjects. *Scand. J. Clin. Lab Invest* **1972**, 29, 69-74.

**-F-**

Fanning, A. S.; Anderson, J. M. Protein-Protein Interactions: PDZ Domain Networks. *Curr. Biol.* **1996**, *6*, 1385-1388.

Fauth, C.; Rossier, B.; Roch-Ramel, F. Transport of Tetraethylammonium by a Kidney Epithelial Cell Line (LLC- PK1). *Am. J. Physiol* **1988**, *254*, F351-F357.

Feild, J. A.; Zhang, L.; Brun, K. A.; Brooks, D. P.; Edwards, R. M. Cloning and Functional Characterization of a Sodium-Dependent Phosphate Transporter Expressed in Human Lung and Small Intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *258*, 578-582.

Filipovic, D. M.; Reeves, W. B. Hydrogen Peroxide Activates Glibenclamide-Sensitive K<sup>+</sup> Channels in LLC- PK1 Cells. *Am. J. Physiol* **1997**, *272*, C737-C743.

Filipovic, D. M.; Adebajo, O. A.; Zaidi, M.; Reeves, W. B. Functional and Molecular Evidence for P2X Receptors in LLC-PK1 Cells. *Am. J. Physiol* **1998**, *274*, F1070-F1077.

Fisher D.R., Swint M.J., Kathren R.L. Evaluation of health effects in Saquoyah Fuels Corporation Workers from accidental exposure to uranium hexafluoride. Washington D.C. Nuclear Regulatory Commission. Report NUREG/CR-5566, **1990**.

Flamenbaum, W.; Huddleston, M. L.; McNeil, J. S.; Hamburger, R. J. Uranyl Nitrate-Induced Acute Renal Failure in the Rat: Micropuncture and Renal Hemodynamic Studies. *Kidney Int.* **1974**, *6*, 408-418.

Flamenbaum, W.; Hamburger, R. J.; Huddleston, M. L.; Kaufman, J.; McNeil, J. S.; Schwartz, J. H.; Nagle, R. The Initiation Phase of Experimental Acute Renal Failure: an Evaluation of Uranyl Nitrate-Induced Acute Renal Failure in the Rat. *Kidney Int. Suppl* **1976**, *6*, S115-S122.

Floren, C.; Tekaya, L.; Escaig, F.; Labejof, L.; Mouthon, G.; Galle, P. Analytical Microscopy Observations of Rat Enterocytes After Oral Administration of Soluble Salts of Lanthanides, Actinides and Elements of Group III-A of the Periodic Chart. *Cell Mo.* **2001**.

Forgac, M. Structure and Properties of the Coated Vesicle (H<sup>+</sup>)-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **1992**, *24*, 341-350.

Forster, I.; Hernando, N.; Biber, J.; Murer, H. The Voltage Dependence of a Cloned Mammalian Renal Type II Na<sup>+</sup>/Pi Cotransporter (NaPi-2). *J. Gen. Physiol* **1998**, *112*, 1-18.

Forster, I.; Biber, J.; Murer, H. Electrophysiological Analysis of Renal Na<sup>+</sup>-Coupled Divalent Anion Transporters. *Pharm. Biotechnol.* **1999**, *12*, 251-267.

Forster, I. C.; Wagner, C. A.; Busch, A. E.; Lang, F.; Biber, J.; Hernando, N.; Murer, H.; Werner, A. Electrophysiological Characterization of the Flounder Type II Na<sup>+</sup>/Pi Cotransporter (NaPi-5) Expressed in *Xenopus Laevis* Oocytes. *J. Membr. Biol.* **1997**, *160*, 9-25.

Forster, I. C.; Loo, D. D.; Eskandari, S. Stoichiometry and Na<sup>+</sup> Binding Cooperativity of Rat and Flounder Renal Type II Na<sup>+</sup>-Pi Cotransporters. *Am. J. Physiol* **1999**, *276*, F644-F649.

Foulkes, E. C. Glomerular Filtration and Renal Plasma Flow in Uranium-Poisoned Rabbits. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1971**, *20*, 380-385.

Fra, A. M.; Williamson, E.; Simons, K.; Parton, R. G. De Novo Formation of Caveolae in Lymphocytes by Expression of VIP21- Caveolin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1995**, *92*, 8655-8659.

Friedman, P. A.; Gesek, F. A. Cellular Calcium Transport in Renal Epithelia: Measurement, Mechanisms, and Regulation. *Physiol Rev.* **1995**, *75*, 429-471.

Frost S.E.; Takala J.M. International dosimetry in the canadian uranium industry. *Radiat.Prot.Dosimetry.* *53*, 249-254. 1994.

Furuya, R.; Kumagai, H.; Hishida, A. Acquired Resistance to Rechallenge Injury With Uranyl Acetate in LLC- PK1 Cells. *J. Lab Clin. Med.* **1997**, *129*, 347-355.

## -G-

Gaidarov, I.; Keen, J. H. Phosphoinositide-AP-2 Interactions Required for Targeting to Plasma Membrane Clathrin-Coated Pits. *J. Cell Biol.* **1999**, *146*, 755-764.

Galle P. Rôle des lysosomes et des mitochondries dans les phénomènes de concentration et d'élimination d'éléments minéraux (uranium et or) par le rein. *J.Microscopie* *19*, 17-24. 1974.

Galle P. Metabolism and toxicity of uranium. In : Proceedings, Meeting on radionuclide toxicity. Masson, Paris. **1982**, 224-240.

Galle P. Métabolisme et toxicité de l'uranium. Deuxième édition, Toxiques nucléaires, Editions Masson, Paris, **1997**, 184-205.

Gambini D.J. et Granier R. Manuel pratique de radioprotection. Editions Médicales Internationales, Paris, **1992**.

Gekle, M.; Mildenerger, S.; Freudinger, R.; Silbernagl, S. Endosomal Alkalinization Reduces J<sub>max</sub> and K<sub>m</sub> of Albumin Receptor- Mediated Endocytosis in OK Cells. *Am. J. Physiol* **1995**, *268*, F899-F906.

Gekle, M.; Mildenerger, S.; Freudinger, R.; Schwerdt, G.; Silbernagl, S. Albumin Endocytosis in OK Cells: Dependence on Actin and Microtubules and Regulation by Protein Kinases. *Am. J. Physiol* **1997**, *272*, F668-F677.

Ghadially, F. N.; Yang-Steppuhn, S. E.; Lalonde, J. M. The Effect of Uranyl Acetate on Human Lymphoblastoid Cells (RPMI 6410) and HeLa Cells. *Br. J. Exp. Pathol.* **1982**, *63*, 227-234.

Ghadially, F. N.; Lalonde, J. M.; Yang-Steppuhn, S. Uraniosomes Produced in Cultured Rabbit Kidney Cells by Uranyl Acetate. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* **1982**, *39*, 21-30.

Ghadially, F. N.; Lalonde, J. M.; Yong, N. K. Uraniosomes Produced in the Synovial Membrane by Uranyl Acetate. *Pathology* **1982**, *14*, 121-127.

Gindler J.E. Physical and chemical properties of uranium. In : Hodge H.C., Stannard J.N., Hursh J.B. eds. Uranium, plutonium, transplutanic elements : Handbook of experimental pharmacology,. New York : Springer-Verlag. **1973**, *36*, 69-164.

Gluck, S. L. The Structure and Biochemistry of the Vacuolar H<sup>+</sup> ATPase in Proximal and Distal Urinary Acidification. *J. Bioenerg. Biomembr.* **1992**, *24*, 351-359.

Goel, K. A.; Garg, V. K.; Garg, V. Histopathology of Kidney of Albino Rat Poisoned With Uranyl Nitrate. *Bull. Environ. Contam Toxicol.* **1980**, *24*, 9-12.

Goodford, P. J.; Wolowyk, M. W. Localization of Cation Interactions in the Smooth Muscle of the Guinea- Pig Taenia Coli. *J. Physiol* **1972**, *224*, 521-535.

Gottlieb, T. A.; Ivanov, I. E.; Adesnik, M.; Sabatini, D. D. Actin Microfilaments Play a Critical Role in Endocytosis at the Apical but Not the Basolateral Surface of Polarized Epithelial Cells.

Green, D. R.; Reed, J. C. Mitochondria and Apoptosis. *Science* **1998**, *281*, 1309-1312.

Greenberg, S.; Chang, P.; Silverstein, S. C. Tyrosine Phosphorylation Is Required for Fc Receptor-Mediated Phagocytosis in Mouse Macrophages. *J. Exp. Med.* **1993**, *177*, 529-534.

Griffin, F. M., Jr.; Griffin, J. A.; Leider, J. E.; Silverstein, S. C. Studies on the Mechanism of Phagocytosis. I. Requirements for Circumferential Attachment of Particle-Bound Ligands to Specific Receptors on the Macrophage Plasma Membrane. *J. Exp. Med.* **1975**, *142*, 1263-1282.

Griffin, F. M., Jr.; Griffin, J. A.; Silverstein, S. C. Studies on the Mechanism of Phagocytosis. II. The Interaction of Macrophages With Anti-Immunoglobulin IgG-Coated Bone Marrow-Derived Lymphocytes. *J. Exp. Med.* **1976**, *144*, 788-809.

Griffith, D. A.; Jarvis, S. M. High Affinity Sodium-Dependent Nucleobase Transport in Cultured Renal Epithelial Cells (LLC-PK1). *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 20085-20090.

Griffiths, G.; Back, R.; Marsh, M. A Quantitative Analysis of the Endocytic Pathway in Baby Hamster Kidney Cells. *J. Cell Biol.* **1989**, *109*, 2703-2720.

Grundemann, D.; Babin-Ebell, J.; Martel, F.; Ording, N.; Schmidt, A.; Schomig, E. Primary Structure and Functional Expression of the Apical Organic Cation Transporter From Kidney Epithelial LLC-PK1 Cells. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 10408-10413.

Gstraunthaler, G.; Pfaller, W.; Kotanko, P. Biochemical Characterization of Renal Epithelial Cell Cultures (LLC-PK1 and MDCK). *Am. J. Physiol* **1985**, *248*, F536-F544.

Guo, J.; Iida-Klein, A.; Huang, X.; Abou-Samra, A. B.; Segre, G. V.; Bringhurst, F. R. Parathyroid Hormone (PTH)/PTH-Related Peptide Receptor Density Modulates Activation of Phospholipase C and Phosphate Transport by PTH in LLC-PK1 Cells. *Endocrinology* **1995**, *136*, 3884-3891.

Gupta, A.; Guo, X. L.; Alvarez, U. M.; Hruska, K. A. Regulation of Sodium-Dependent Phosphate Transport in Osteoclasts. *J. Clin. Invest* **1997**, *100*, 538-549.

Gupta, A.; Tenenhouse, H. S.; Hoag, H. M.; Wang, D.; Khadeer, M. A.; Namba, N.; Feng, X.; Hruska, K. A. Identification of the Type II Na(+)-Pi Cotransporter (Npt2) in the Osteoclast and the Skeletal Phenotype of Npt2<sup>-/-</sup> Mice. *Bone* **2001**, *29*, 467-476.

-H-

Haas, J. A.; Berndt, T.; Knox, F. G. Nephron Heterogeneity of Phosphate Reabsorption. *Am. J. Physiol* **1978**, *234*, F287-F290.

Haffner, C.; Takei, K.; Chen, H.; Ringstad, N.; Hudson, A.; Butler, M. H.; Salcini, A. E.; Di Fiore, P. P.; De Camilli, P. Synaptotagmin 1: Localization on Coated Endocytic Intermediates in Nerve Terminals and Interaction of Its 170 KDa Isoform With Eps15. *FEBS Lett.* **1997**, 175-180.

Haigler, H. T.; McKanna, J. A.; Cohen, S. Rapid Stimulation of Pinocytosis in Human Carcinoma Cells A-431 by Epidermal Growth Factor. *J. Cell Biol.* **1979**, *83*, 82-90.

Haley, D. P. Morphologic Changes in Uranyl Nitrate-Induced Acute Renal Failure in Saline- and Water-Drinking Rats. *Lab Invest* **1982**, *46*, 196-208.

Hammerman, M. R.; Karl, I. E.; Hruska, K. A. Regulation of Canine Renal Vesicle Pi Transport by Growth Hormone and Parathyroid Hormone. *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *603*, 322-335.

Handlogten, M. E.; Shiraishi, N.; Awata, H.; Huang, C.; Miller, R. T. Extracellular Ca(2+)-Sensing Receptor Is a Promiscuous Divalent Cation Sensor That Responds to Lead. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **2000**, F1083-F1091.

Hansch, E.; Forgo, J.; Murer, H.; Biber, J. Role of Microtubules in the Adaptive Response to Low Phosphate of Na/Pi Cotransport in Opossum Kidney Cells. *Pflugers Arch.* **1993**, *422*, 516-522.

Hao, W.; Luo, Z.; Zheng, L.; Prasad, K.; Lafer, E. M. AP180 and AP-2 Interact Directly in a Complex That Cooperatively Assembles Clathrin.

Hartmann, C. M.; Wagner, C. A.; Busch, A. E.; Markovich, D.; Biber, J.; Lang, F.; Murer, H. Transport Characteristics of a Murine Renal Na/Pi-Cotransporter. *Pflugers Arch.* **1995**, *430*, 830-836.

Harvey, W. R. Physiology of V-ATPases. *J. Exp. Biol.* **1992**, *172*, 1-17.

Hashimoto, Y.; Ozaki, J.; Yasuhara, M.; Hori, R.; Suga, S.; Itoh, H.; Nakao, K.; Inui, K. Functional Evidence for an Apical ANP Receptor in LLC-PK1 Kidney Epithelial Cells. *Eur. J. Pharmacol.* **1994**, *268*, 443-445.

Hayes, G.; Busch, A.; Lotscher, M.; Waldegger, S.; Lang, F.; Verrey, F.; Biber, J.; Murer, H. Role of N-Linked Glycosylation in Rat Renal Na/Pi-Cotransport. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 24143-24149.

Hayes, G.; Forgo, J.; Bringham, F. R.; Segre, G.; Murer, H. Expression of Parathyroid Hormone Receptors in MDCK and LLC-PK1 Cells. *Pflugers Arch.* **1995**, *430*, 636-644.

Hayes, G.; Busch, A. E.; Lang, F.; Biber, J.; Murer, H. Protein Kinase C Consensus Sites and the Regulation of Renal Na/Pi- Cotransport (NaPi-2) Expressed in XENOPUS Laevis Oocytes. *Pflugers Arch.* **1995**, *430*, 819-824.

Henge-Napoli, M. H.; Ansoborlo, E.; Claraz, M.; Berry, J. P.; Cheynet, M. C. Role of Alveolar Macrophages in the Dissolution of Two Different Industrial Uranium Oxides. *Cell Mol. Biol. (Noisy. -le-grand)* **1996**, *42*, 413-420.

Henis, Y. I.; Elson, E. L. Differences in the Response of Several Cell Types to Inhibition of Surface Receptor Mobility by Local Concanavalin A Binding. *Exp. Cell Res.* **1981**, *136*, 189-201.

Henley, J. R.; Krueger, E. W.; Oswald, B. J.; McNiven, M. A. Dynamin-Mediated Internalization of Caveolae. *J. Cell Biol.* **1998**, *141*, 85-99.

Hernando, N.; Traebert, M.; Forster, I.; Biber, J.; Murer, H. Effect of Two Tyrosine Mutations on the Activity and Regulation of the Renal Type II Na/Pi-Cotransporter Expressed in Oocytes. *J. Membr. Biol.* **1999**, *168*, 275-282.

Hernando, N.; Sheikh, S.; Karim-Jimenez, Z.; Galliker, H.; Forgo, J.; Biber, J.; Murer, H. Asymmetrical Targeting of Type II Na-P(i) Cotransporters in Renal and Intestinal Epithelial Cell Lines. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **2000**, *278*, F361-F368.

Hernando, N.; Karim-Jimenez, Z.; Biber, J.; Murer, H. Molecular Determinants for Apical Expression and Regulatory Membrane Retrieval of the Type IIa Na/Pi Cotransporter. *Kidney Int.* **2001**, *60*, 431-435.

Herzlinger, D. A.; Easton, T. G.; Ojakian, G. K. The MDCK Epithelial Cell Line Expresses a Cell Surface Antigen of the Kidney Distal Tubule. *J. Cell Biol.* **1982**, *93*, 269-277.

Heuser, J. E.; Anderson, R. G. Hypertonic Media Inhibit Receptor-Mediated Endocytosis by Blocking Clathrin-Coated Pit Formation. *J. Cell Biol.* **1989**, *108*, 389-400.

Hewlett, L. J.; Prescott, A. R.; Watts, C. The Coated Pit and Macropinocytic Pathways Serve Distinct Endosome Populations. *J. Cell Biol.* **1994**, *124*, 689-703.

Hightower, L. E. Heat Shock, Stress Proteins, Chaperones, and Proteotoxicity. *Cell* **1991**, *66*, 191-197.

Hilfiker, H.; Hattenhauer, O.; Traebert, M.; Forster, I.; Murer, H.; Biber, J. Characterization of a Murine Type II Sodium-Phosphate Cotransporter Expressed in Mammalian Small Intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1998**, *95*, 14564-14569.

Hirst, J.; Robinson, M. S. Clathrin and Adaptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1404*, 173-193.

Hisano, S.; Haga, H.; Li, Z.; Tatsumi, S.; Miyamoto, K. I.; Takeda, E.; Fukui, Y. Immunohistochemical and RT-PCR Detection of Na<sup>+</sup>-Dependent Inorganic Phosphate Cotransporter (NaPi-2) in Rat Brain. *Brain Res.* **1997**, *772*, 149-155.

Hoag, H. M.; Martel, J.; Gauthier, C.; Tenenhouse, H. S. Effects of Npt2 Gene Ablation and Low-Phosphate Diet on Renal Na(+)/Phosphate Cotransport and Cotransporter Gene Expression. *J. Clin. Invest* **1999**, *104*, 679-686.

Hodge H.C. A history of uranium poisoning (1824-1942). In : Hodge H. C, Stannard J.N., Hursh J.B., eds. Uranium, plutonium, transplutanic elements : Handbook of experimental pharmacology. New York : Springer-Verlag. **1953**, 36,5-68.

Hodge H.C. A history of uranium poisoning (1824-1842). In : Hodge H. C, Stannard J. N, Hursh J.B., eds. Uranium, plutonium, transplutanic elements : Handbook of experimental pharmacology. Heidelberg : Springer-Verlag. **1973**, 36, 1-68.

Holstein, S. E.; Ungewickell, H.; Ungewickell, E. Mechanism of Clathrin Basket Dissociation: Separate Functions of Protein Domains of the DnaJ Homologue Auxilin.

Hoppe, A.; Lin, J. T.; Onsgard, M.; Knox, F. G.; Dousa, T. P. Quantitation of the Na(+)-Pi Cotransporter in Renal Cortical Brush Border Membranes. [14C]Phosphonoformic Acid As a Useful Probe to Determine the Density and Its Change in Response to Parathyroid Hormone. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 11528-11536.

Hori, R.; Takano, M.; Okano, T.; Inui, K. Transport of P-Aminohippurate, Tetraethylammonium and D-Glucose in Renal Brush Border Membranes From Rats With Acute Renal Failure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1985**, *233*, 776-781.

Hruska, K. A.; Moskowitz, D.; Esbrit, P.; Civitelli, R.; Westbrook, S.; Huskey, M. Stimulation of Inositol Trisphosphate and Diacylglycerol Production in Renal Tubular Cells by Parathyroid Hormone. **1987**.

Hu, J. H. Nature of Postjunctional Receptors. *Am. J. Physiol* **1972**, *223*, 882-887.

Hu, M. C.; Fan, L.; Crowder, L. A.; Karim-Jimenez, Z.; Murer, H.; Moe, O. W. Dopamine Acutely Stimulates Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger (NHE3) Endocytosis Via Clathrin-Coated Vesicles: Dependence on Protein Kinase A-Mediated NHE3 Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 26906-26915.

Hull, R. N.; Cherry, W. R.; Weaver, G. W. The Origin and Characteristics of a Pig Kidney Cell Strain, LLC-PK. *In Vitro* **1976**, *12*, 670-677.

Husted, R. F.; Welsh, M. J.; Stokes, J. B. Variability of Functional Characteristics of MDCK Cells. *Am. J. Physiol* **1986**, *250*, C214-C221.

**-I-**

Imbert, M.; Chabardes, D.; Montegut, M.; Clique, A.; Morel, F. Adenylate Cyclase Activity Along the Rabbit Nephron As Measured in Single Isolated Segments. *Pflugers Arch.* **1975**, *354*, 213-228.

Inui, K.; Saito, H.; Matsukawa, Y.; Nakao, K.; Morii, N.; Imura, H.; Shimokura, M.; Kiso, Y.; Hori, R. Specific Binding Activities and Cyclic GMP Responses by Atrial Natriuretic Polypeptide in Kidney Epithelial Cell Line (LLC-PK1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1985**, *132*, 253-260.

Ishido, M.; Homma-Takeda, S.; Tohyama, C.; Suzuki, T. Apoptosis in Rat Renal Proximal Tubular Cells Induced by Cadmium. *J. Toxicol. Environ. Health A* **1998**, *55*, 1-12.

**-J-**

Jamison, K.; McGlothlin, W. H. Drug Usage, Personality, Attitudinal, and Behavioral Correlates of Driving Behavior. *J. Psychol.* **1973**, *83*, 123-130.

Jehle, A. W.; Forgo, J.; Biber, J.; Lederer, E.; Krapf, R.; Murer, H. IGF-I and Vanadate Stimulate Na/Pi-Cotransport in OK Cells by Increasing Type II Na/Pi-Cotransporter Protein Stability. *Pflugers Arch.* **1998**, 149-154.

Jin, M.; Snider, M. D. Role of Microtubules in Transferrin Receptor Transport From the Cell Surface to Endosomes and the Golgi Complex. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 18390-18397.

**-K-**

Kandror, K. V.; Stephens, J. M.; Pilch, P. F. Expression and Compartmentalization of Caveolin in Adipose Cells: Coordinate Regulation With and Structural Segregation From GLUT4. *J. Cell Biol.* **1995**, *129*, 999-1006.

Karim-Jimenez, Z.; Hernando, N.; Biber, J.; Murer, H. A Dibasic Motif Involved in Parathyroid Hormone-Induced Down-Regulation of the Type IIa NaPi Cotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2000**, *97*, 12896-12901.

Kato, A.; Hishida, A.; Kobayashi, S.; Honda, N. Glomerular Alterations in Experimental Oliguric and Nonoliguric Acute Renal Failure. *Ren Fail.* **1993**, *15*, 215-224.

Kato, A.; Hishida, A.; Nakajima, T. Effects of Oxygen Free Radical Scavengers on Uranium-Induced Acute Renal Failure in Rats. *Free Radic. Biol. Med.* **1994**, *16*, 855-859.

Kaufmann, M.; Muff, R.; Stieger, B.; Biber, J.; Murer, H.; Fischer, J. A. Apical and Basolateral Parathyroid Hormone Receptors in Rat Renal Cortical Membranes. *Endocrinology* **1994**, *134*, 1173-1178.

Kavanaugh, M. P.; Miller, D. G.; Zhang, W.; Law, W.; Kozak, S. L.; Kabat, D.; Miller, A. D. Cell-Surface Receptors for Gibbon Ape Leukemia Virus and Amphotropic Murine Retrovirus Are Inducible Sodium-Dependent Phosphate Symporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1994**, *91*, 7071-7075.

Kavanaugh, M. P.; Kabat, D. Identification and Characterization of a Widely Expressed Phosphate Transporter/Retrovirus Receptor Family. *Kidney Int.* **1996**, *49*, 959-963.

Keane, A. T.; Polednak, A. P. Retention of Uranium in the Chest: Implications of Findings in Vivo and Postmortem. *Health Phys.* **1983**, *44 Suppl 1*, 391-402.

Keen, J. H.; Willingham, M. C.; Pastan, I. H. Clathrin-Coated Vesicles: Isolation, Dissociation and Factor-Dependent Reassociation of Clathrin Baskets. *Cell* **1979**, *16*, 303-312.

Kempson, S. A.; Ying, A. L.; McAteer, J. A.; Murer, H. Endocytosis and Na<sup>+</sup>/Solute Cotransport in Renal Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 18451-18456.

Kempson, S. A.; Helmle, C.; Abraham, M. I.; Murer, H. Parathyroid Hormone Action on Phosphate Transport Is Inhibited by High Osmolality. *Am. J. Physiol* **1990**, *258*, F1336-F1344.

Kempson, S. A.; Lotscher, M.; Kaissling, B.; Biber, J.; Murer, H.; Levi, M. Parathyroid Hormone Action on Phosphate Transporter mRNA and Protein in Rat Renal Proximal Tubules. *Am. J. Physiol* **1995**, *268*, F784-F791.

Kempson, S. A. Peptide Hormone Action on Renal Phosphate Handling. *Kidney Int.* **1996**, *49*, 1005-1009.

Khundmiri, S. J.; Lederer, E. PTH and DA Regulate Na-K ATPase Through Divergent Pathways.

Kiebzak, G. M.; Yusufi, A. N.; Kusano, E.; Braun-Werness, J.; Dousa, T. P. ATP and CAMP System in the in Vitro Response of Microdissected Cortical Tubules to PTH. *Am. J. Physiol* **1985**, *248*, F152-F159.

Kifor, O.; MacLeod, R. J.; Diaz, R.; Bai, M.; Yamaguchi, T.; Yao, T.; Kifor, I.; Brown, E. M. Regulation of MAP Kinase by Calcium-Sensing Receptor in Bovine Parathyroid and CaR-Transfected HEK293 Cells.

Kirchhausen, T.; Bonifacino, J. S.; Riezman, H. Linking Cargo to Vesicle Formation: Receptor Tail Interactions With Coat Proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1997**, *9*, 488-495.

Kirchhausen, T. Adaptors for Clathrin-Mediated Traffic. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1999**, *15*, 705-732.

- Kirchhausen, T. Clathrin. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 699-727.
- Kirschbaum, B. B. Aggregation of Renal Brush Border Membranes by Concanavalin A and Heavy Metals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1982**, *64*, 10-19.
- Kirschbaum, B. B. Interactions Between Renal Brush Border Membranes and Polyamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1984**, *229*, 409-416.
- Knauss, T. C.; Weinberg, J. M.; Humes, H. D. Alterations in Renal Cortical Phospholipid Content Induced by Gentamicin: Time Course, Specificity, and Subcellular Localization. *Am. J. Physiol* **1983**, *244*, F535-F546.
- Kobayashi, S.; Nagase, M.; Honda, N.; Hishida, A. Glomerular Alterations in Uranyl Acetate-Induced Acute Renal Failure in Rabbits. *Kidney Int.* **1984**, *26*, 808-815.
- Kohl, B.; Wagner, C. A.; Huelseweh, B.; Busch, A. E.; Werner, A. The Na<sup>+</sup>-Phosphate Cotransport System (NaPi-II) With a Cleaved Protein Backbone: Implications on Function and Membrane Insertion. *J. Physiol* **1998**, *508* ( Pt 2), 341-350.
- Komatsuda, A.; Wakui, H.; Ohtani, H.; Imai, H.; Miura, A. B.; Itoh, H. Intracellular Localization of HSP73 and HSP90 in Rat Kidneys With Acute Lysosomal Theaurismosis. *Pathol. Int.* **1999**, *49*, 513-518.
- Komatsuda, A.; Wakui, H.; Oyama, Y.; Imai, H.; Miura, A. B.; Itoh, H.; Tashima, Y. Overexpression of the Human 72 KDa Heat Shock Protein in Renal Tubular Cells Confers Resistance Against Oxidative Injury and Cisplatin Toxicity. *Nephrol. Dial. Transplant.* **1999**, *14*, 1385-1390.
- Kondoh, M.; Araragi, S.; Sato, K.; Higashimoto, M.; Takiguchi, M.; Sato, M. Cadmium Induces Apoptosis Partly Via Caspase-9 Activation in HL-60 Cells. *T.* **2002**.
- Kosaka, T.; Ikeda, K. Reversible Blockage of Membrane Retrieval and Endocytosis in the Garland Cell of the Temperature-Sensitive Mutant of *Drosophila Melanogaster*, Shibirets1. *J. Cell Biol.* **1983**, *97*, 499-507.
- Koseki, C.; Herzlinger, D.; al Awqati, Q. Apoptosis in Metanephric Development. *J. Cell Biol.* **1992**, *119*, 1327-1333.
- Krammer, P. H. CD95's Deadly Mission in the Immune System. *Nature* **2000**, *407*, 789-795.
- Kroemer, G.; Reed, J. C. Mitochondrial Control of Cell Death. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 513-519.
- Kurnik, B. R.; Hruska, K. A. Effects of 1,25-Dihydroxycholecalciferol on Phosphate Transport in Vitamin D-Deprived Rats. *Am. J. Physiol* **1984**, *247*, F177-F184.
- Kurnik, B. R.; Hruska, K. A. Mechanism of Stimulation of Renal Phosphate Transport by 1,25-Dihydroxycholecalciferol. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *817*, 42-50.

Lamaze, C.; Schmid, S. L. The Emergence of Clathrin-Independent Pinocytotic Pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1995**, *7*, 573-580.

Lamaze, C.; Fujimoto, L. M.; Yin, H. L.; Schmid, S. L. The Actin Cytoskeleton Is Required for Receptor-Mediated Endocytosis in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 20332-20335.

Lambert, G.; Traebert, M.; Hernando, N.; Biber, J.; Murer, H. Studies on the Topology of the Renal Type II NaPi-Cotransporter. *Pflugers Arch.* **1999**, *437*, 972-978.

Lang, S.; Kosma, V. M.; Kumlin, T.; Halinen, A.; Salonen, R. O.; Servomaa, K.; Rytomaa, T.; Ruuskanen, J. Distribution and Short-Term Effects of Intratracheally Instilled Neutron-Irradiated UO<sub>2</sub> Particles in the Rat. *Environ. Res.* **1994**, *65*, 119-131.

Leach, L. J.; Yuile, C. L.; Hodge, H. C.; Sylvester, G. E.; Wilson, H. B. A Five-Year Inhalation Study With Natural Uranium Dioxide (UO<sub>2</sub>) Dust. II. Postexposure Retention and Biologic Effects in the Monkey, Dog and Rat. *Health Phys.* **1973**, *25*, 239-258.

Leach L., Gelein R. The acute of the hydrolysis products of uranium hexafluoride (UF<sub>6</sub>) when inhaled by rat and guinea pig. US Department of Energy K/SUB/81-9039. **1984**.

Lederer, E. D.; Sohi, S. S.; Mathiesen, J. M.; Klein, J. B. Regulation of Expression of Type II Sodium-Phosphate Cotransporters by Protein Kinases A and C. *Am. J. Physiol* **1998**, *275*, F270-F277.

Lederer, E. D.; Sohi, S. S.; McLeish, K. R. Parathyroid Hormone Stimulates Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) Activity Through Two Independent Signal Transduction Pathways: Role of ERK in Sodium-Phosphate Cotransport. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2000**, *11*, 222-231.

Lee, A.; Frank, D. W.; Marks, M. S.; Lemmon, M. A. Dominant-Negative Inhibition of Receptor-Mediated Endocytosis by a Dynamin-1 Mutant With a Defective Pleckstrin Homology Domain. *Curr. Biol.* **1999**, *9*, 261-264.

Leggett, R. W. The Behavior and Chemical Toxicity of U in the Kidney: a Reassessment. *Health Phys.* **1989**, *57*, 365-383.

Levi, M.; Lotscher, M.; Sorribas, V.; Custer, M.; Arar, M.; Kaissling, B.; Murer, H.; Biber, J. Cellular Mechanisms of Acute and Chronic Adaptation of Rat Renal P(i) Transporter to Alterations in Dietary P(i). *Am. J. Physiol* **1994**, *267*, F900-F908.

Levi, M.; Kempson, S. A.; Lotscher, M.; Biber, J.; Murer, H. Molecular Regulation of Renal Phosphate Transport. *J. Membr. Biol.* **1996**, *154*, 1-9.

Li, H.; Ren, P.; Onwochei, M.; Ruch, R. J.; Xie, Z. Regulation of Rat Na<sup>+</sup>/Pi Cotransporter-1 Gene Expression: the Roles of Glucose and Insulin. *Am. J. Physiol* **1996**, *271*, E1021-E1028.

Li, P.; Nijhawan, D.; Budihardjo, I.; Srinivasula, S. M.; Ahmad, M.; Alnemri, E. S.; Wang, X. Cytochrome c and DATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell* **1997**, *91*, 479-489.

Lide D.R. Uranium. In : Handbook of chemistry and physics. 74<sup>th</sup> edition, CRC press. **1994**, 31-32

Lim, I. K.; Lee, K. H.; Han, B. D.; Jang, J. J.; Yun, T. K. Uranyl Nitrate Induced Polyuric Acute Tubular Necrosis in Rats. *Yonsei Med. J.* **1987**, *28*, 38-48.

Lin-Shiau, S. Y.; Fu, W. M.; Lee, C. Y. Effects of Uranyl Ions on Neuromuscular Transmission of Chick Biventer Cervicis Muscle. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **1979**, *241*, 332-343.

Lin, R. H.; Wu, L. J.; Lee, C. H.; Lin-Shiau, S. Y. Cytogenetic Toxicity of Uranyl Nitrate in Chinese Hamster Ovary Cells. *Mutat. Res.* **1993**, *319*, 197-203.

Lindquist, S.; Craig, E. A. The Heat-Shock Proteins. *Annu. Rev. Genet.* **1988**, *22*, 631-677.

Lisanti, M. P.; Scherer, P. E.; Vidugiriene, J.; Tang, Z.; Hermanowski-Vosatka, A.; Tu, Y. H.; Cook, R. F.; Sargiacomo, M. Characterization of Caveolin-Rich Membrane Domains Isolated From an Endothelial-Rich Source: Implications for Human Disease. *J. Cell Biol.* **1994**, *126*, 111-126.

Lopez, R.; Diaz Sylvester, P. L.; Ubios, A. M.; Cabrini, R. L. Percutaneous Toxicity of Uranyl Nitrate: Its Effect in Terms of Exposure Area and Time. *Health Phys.* **2000**, *78*, 434-437.

Lotscher, M.; Wilson, P.; Nguyen, S.; Kaissling, B.; Biber, J.; Murer, H.; Levi, M. New Aspects of Adaptation of Rat Renal Na-Pi Cotransporter to Alterations in Dietary Phosphate. *Kidney Int.* **1996**, *49*, 1012-1018.

Lotscher, M.; Kaissling, B.; Biber, J.; Murer, H.; Levi, M. Role of Microtubules in the Rapid Regulation of Renal Phosphate Transport in Response to Acute Alterations in Dietary Phosphate Content. *J. Clin. Invest* **1997**, *99*, 1302-1312.

Lotscher, M.; Scarpetta, Y.; Levi, M.; Halaihel, N.; Wang, H.; Zajicek, H. K.; Biber, J.; Murer, H.; Kaissling, B. Rapid Downregulation of Rat Renal Na/P(i) Cotransporter in Response to Parathyroid Hormone Involves Microtubule Rearrangement. *J. Clin. Invest* **1999**, *104*, 483-494.

Luissenhop A.J.; Gallimore J.C.; Sweet W.H.; Struwness E.G.; Robinson J. The toxicity in man of hexavalent uranium following intravenous administration. *Am.J.Roentgenol* **79**, 83-100. 1958.

Lutz, W.; Kumar, R. Hypertonic Sucrose Treatment Enhances Second Messenger Accumulation in Vasopressin-Sensitive Cells. *Am. J. Physiol* **1993**, *264*, F228-F233.

**-M-**

Madic . From the reactor to waste disposal: the backend of the nuclear fuel cycle with emphasis on France. *Radiat.Prot.Dosimetry*. 26, 15-22. 2002.

Magagnin, S.; Werner, A.; Markovich, D.; Sorribas, V.; Stange, G.; Biber, J.; Murer, H. Expression Cloning of Human and Rat Renal Cortex Na/Pi Cotransport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1993**, *90*, 5979-5983.

Malmstrom, K.; Murer, H. Parathyroid Hormone Inhibits Phosphate Transport in OK Cells but Not in LLC-PK1 and JTC-12.P3 Cells. *Am. J. Physiol* **1986**, *251*, C23-C31.

Malmstrom, K.; Murer, H. Parathyroid Hormone Regulates Phosphate Transport in OK Cells Via an Irreversible Inactivation of a Membrane Protein. *FEBS Lett.* **1987**, *216*, 257-260.

Malmstrom, K.; Stange, G.; Murer, H. Intracellular Cascades in the Parathyroid-Hormone-Dependent Regulation of Na<sup>+</sup>/Phosphate Cotransport in OK Cells. *Biochem. J.* **1988**, *251*, 207-213.

Malstrom, K.; Stange, G.; Murer, H. Identification of Proximal Tubular Transport Functions in the Established Kidney Cell Line, OK. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *902*, 269-277.

Mamdouh, Z.; Giocondi, M. C.; Laprade, R.; Le Grimellec, C. Temperature Dependence of Endocytosis in Renal Epithelial Cells in Culture. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1282*, 171-173.

Mansfield, K.; Teixeira, C. C.; Adams, C. S.; Shapiro, I. M. Phosphate Ions Mediate Chondrocyte Apoptosis Through a Plasma Membrane Transporter Mechanism. *Bone* **2001**, *28*, 1-8.

Markovich, D.; Verri, T.; Sorribas, V.; Forgo, J.; Biber, J.; Murer, H. Regulation of Opossum Kidney (OK) Cell Na/Pi Cotransport by Pi Deprivation Involves MRNA Stability. *Pflugers Arch.* **1995**, *430*, 459-463.

Marsh, M.; Helenius, A. Adsorptive Endocytosis of Semliki Forest Virus. *J. Mol. Biol.* **1980**, *142*, 439-454.

Marshansky, V.; Fleiser, A.; Noel, J.; Bourgoin, S.; Vinay, P. Isolation of Heavy Endosomes From Dog Proximal Tubules in Suspension. *J. Membr. Biol.* **1996**, *153*, 59-73.

Martinez, P.; Persson, B. L. Identification, Cloning and Characterization of a Derepressible Na<sup>+</sup>- Coupled Phosphate Transporter in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **1998**, *258*, 628-638.

Matsuoka, M.; Wispriyono, B.; Igisu, H. Induction of C-Fos Gene by Mercury Chloride in LLC-PK1 Cells. *Chem. Biol. Interact.* **1997**, *108*, 95-106.

Matsuoka, M.; Wispriyono, B.; Iryo, Y.; Igisu, H. Mercury Chloride Activates C-Jun N-Terminal Kinase and Induces C-Jun Expression in LLC-PK1 Cells. *Toxicol. Sci.* **2000**, *53*, 361-368.

May, R. C.; Machesky, L. M. Phagocytosis and the Actin Cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **2001**, *114*, 1061-1077.

McDiarmid, M. A.; Keogh, J. P.; Hooper, F. J.; McPhaul, K.; Squibb, K.; Kane, R.; DiPino, R.; Kabat, M.; Kaup, B.; Anderson, L.; Hoover, D.; Brown, L.; Hamilton, M.; Jacobson-Kram, D.; Burrows, B.; Walsh, M. Health Effects of Depleted Uranium on Exposed Gulf War Veterans. *Environ. Res.* **2000**, *82*, 168-180.

McDiarmid, M. A.; Engelhardt, S. M.; Oliver, M. Urinary Uranium Concentrations in an Enlarged Gulf War Veteran Cohort. *Health Phys.* **2001**, *80*, 270-273.

McDiarmid, M. A.; Squibb, K.; Engelhardt, S.; Oliver, M.; Gucer, P.; Wilson, P. D.; Kane, R.; Kabat, M.; Kaup, B.; Anderson, L.; Hoover, D.; Brown, L.; Jacobson-Kram, D. Surveillance of Depleted Uranium Exposed Gulf War Veterans: Health Effects Observed in an Enlarged "Friendly Fire" Cohort. *J. Occup. Environ. Med.* **2001**, *43*, 991-1000.

McDiarmid, M. A. Depleted Uranium and Public Health. *BMJ* **2001**, *322*, 123-124.

McDiarmid, M. A.; Hooper, F. J.; Squibb, K.; McPhaul, K.; Engelhardt, S. M.; Kane, R.; DiPino, R.; Kabat, M. Health Effects and Biological Monitoring Results of Gulf War Veterans Exposed to Depleted Uranium. *Mil. Med.* **2002**, *167*, 123-124.

McDonald-Taylor, C. K.; Singh, A.; Gilman, A. Uranyl Nitrate-Induced Proximal Tubule Alterations in Rabbits: a Quantitative Analysis. *Toxicol. Pathol.* **1997**, *25*, 381-389.

Meier, K. E.; Sperling, D. M.; Insel, P. A. Agonist-Mediated Regulation of Alpha 1- and Beta 2-Adrenergic Receptors in Cloned MDCK Cells. *Am. J. Physiol* **1985**, *249*, C69-C77.

Mellman, I.; Fuchs, R.; Helenius, A. Acidification of the Endocytic and Exocytic Pathways. *Annu. Rev. Biochem.* **1986**, *55*, 663-700.

Mellman, I. The Importance of Being Acid: the Role of Acidification in Intracellular Membrane Traffic. *J. Exp. Biol.* **1992**, *172*, 39-45.

Meltzer, V.; Weinreb, S.; Bellorin-Font, E.; Hruska, K. A. Parathyroid Hormone Stimulation of Renal Phosphoinositide Metabolism Is a Cyclic Nucleotide-Independent Effect. *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, *712*, 258-267.

Miller, A. C.; Blakely, W. F.; Livengood, D.; Whittaker, T.; Xu, J.; Ejnik, J. W.; Hamilton, M. M.; Parlette, E.; John, T. S.; Gerstenberg, H. M.; Hsu, H. Transformation of Human Osteoblast Cells to the Tumorigenic Phenotype by Depleted Uranium-Uranyl Chloride. *Environ. Health Perspect.* **1998**, *106*, 465-471.

Miller, A. C.; Fuciarelli, A. F.; Jackson, W. E.; Ejnik, E. J.; Emond, C.; Strocko, S.; Hogan, J.; Page, N.; Pellmar, T. Urinary and Serum Mutagenicity Studies With Rats Implanted With Depleted Uranium or Tantalum Pellets. *Mutagenesis* **1998**, *13*, 643-648.

Miller, A. C.; Xu, J.; Stewart, M.; McClain, D. Suppression of Depleted Uranium-Induced Neoplastic Transformation of Human Cells by the Phenyl Fatty Acid, Phenyl Acetate: Chemoprevention by Targeting the P21RAS Protein Pathway. *Radiat. Res.* **2001**, *155*, 163-170.

Miller, A. C.; Mog, S.; McKinney, L.; Luo, L.; Allen, J.; Xu, J.; Page, N. Neoplastic Transformation of Human Osteoblast Cells to the Tumorigenic Phenotype by Heavy Metal-Tungsten Alloy Particles: Induction of Genotoxic Effects. *Carcinogenesis* **2001**, *22*, 115-125.

Miller, A. C.; Stewart, M.; Brooks, K.; Shi, L.; Page, N. Depleted Uranium-Catalyzed Oxidative DNA Damage: Absence of Significant Alpha Particle Decay. *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *91*, 246-252.

Miller, A. C.; Xu, J.; Stewart, M.; Brooks, K.; Hodge, S.; Shi, L.; Page, N.; McClain, D. Observation of Radiation-Specific Damage in Human Cells Exposed to Depleted Uranium: Dicentric Frequency and Neoplastic Transformation As Endpoints. *Radiat. Prot. Dosimetry.* **2002**, *99*, 275-278.

Miller, A. C.; Xu, J.; Stewart, M.; Prasanna, P. G.; Page, N. Potential Late Health Effects of Depleted Uranium and Tungsten Used in Armor-Piercing Munitions: Comparison of Neoplastic Transformation and Genotoxicity With the Known Carcinogen Nickel. *Mil. Med.* **2002**, *167*, 120-122.

Miller, R. R., Jr.; Heckel, C. D.; Koss, W. J.; Montague, S. L.; Greenman, A. L. Ethanol- and Nicotine-Induced Membrane Changes in Embryonic and Neonatal Chick Brains. *Comp Biochem. Physiol C. Toxicol. Pharmacol.* **2001**, 163-178.

Mirto, H.; Barrouillet, M. P.; Henge-Napoli, M. H.; Ansoborlo, E.; Fournier, M.; Cambar, J. Influence of Uranium(VI) Speciation for the Evaluation of in Vitro Uranium Cytotoxicity on LLC-PK1 Cells. *Hum. Exp. Toxicol.* **1999**, *18*, 180-187.

Mirto, H.; Henge-Napoli, M. H.; Gibert, R.; Ansoborlo, E.; Fournier, M.; Cambar, J. Intracellular Behaviour of Uranium(VI) on Renal Epithelial Cell in Culture (LLC-PK1): Influence of Uranium Speciation. *Toxicol. Lett.* **1999**, *104*, 249-256.

Miyamoto, K.; Tatsumi, S.; Sonoda, T.; Yamamoto, H.; Minami, H.; Taketani, Y.; Takeda, E. Cloning and Functional Expression of a Na(+)-Dependent Phosphate Co-Transporter From Human Kidney: cDNA Cloning and Functional Expression. *Biochem. J.* **1995**, *305 ( Pt 1)*, 81-85.

Miyamoto, K.; Ito, M.; Segawa, H.; Kuwahata, M. Secondary Hyperparathyroidism and Phosphate Sensing in Parathyroid Glands. *J. Med. Invest* **2000**, *47*, 118-122.

Mizuno S., Fujita K., Furuy R., Hishid A., Ito H., Tashim Y., Kumagai H. Association of HSP73 with the acquired resistance to uranyl acetate-induced acute renal failure. *Toxicology* **1997**, *117*, 183-191.

Montesano, R.; Roth, J.; Robert, A.; Orci, L. Non-Coated Membrane Invaginations Are Involved in Binding and Internalization of Cholera and Tetanus Toxins. *Nature* **1982**, *296*, 651-653.

Morel, F.; Chabardes, D.; Imbert, M. Functional Segmentation of the Rabbit Distal Tubule by Microdetermination of Hormone-Dependent Adenylate Cyclase Activity. *Kidney Int.* **1976**, *9*, 264-277.

Morel, F. Sites of Hormone Action in the Mammalian Nephron. *Am. J. Physiol* **1981**, *240*, F159-F164.

Morris, K. J.; Khanna, P.; Batchelor, A. L. Long-Term Clearance of Inhaled UO<sub>2</sub> Particles From the Pulmonary Region of the Rat. *Health Phys.* **1990**, *58*, 477-485.

Morris, S. A.; Schroder, S.; Plessmann, U.; Weber, K.; Ungewickell, E. Clathrin Assembly Protein AP180: Primary Structure, Domain Organization and Identification of a Clathrin Binding Site. *EMBO J.* **1993**, *12*, 667-675.

Morrow P., Leach L. Metabolic fate and evaluation of injury in rats and dogs following exposure to the hydrolysis products of uranium hexafluoride. US Nuclear Regulatory Commission : NUREG/CR-2268. **1981**.

Morrow, P.; Gelein, R.; Beiter, H.; Scott, J.; Picano, J.; Yuile, C. Inhalation and Intravenous Studies of UF<sub>6</sub>/UO<sub>2</sub>F<sub>2</sub> in Dogs. *Health Phys.* **1982**, *43*, 859-873.

Moss M.A. Study on the effects of uranium on kidney functions. Atomic Energy Control Board, CP 1046, OTTAWA, Canada. **1989**.

Moz, Y.; Silver, J.; Naveh-Many, T. Protein-RNA Interactions Determine the Stability of the Renal NaPi-2 Cotransporter mRNA and Its Translation in Hypophosphatemic Rats. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 25266-25272.

Mueller C.B.; Masson A.D. A study of the pathologic anatomy of the proximal tubules of the mouse produced by various nephrotoxins. *Surg.Forum.* *7*, 641-654. 1956.

Muir J.R. Fish B.R., Jones E.S., Gillum N.L., Thompson J.L. Distribution and excretion of uranium. In : Health physics division annual progress report for period ending. Oak Ridge T.N. Oak Ridge National Laboratory ; ORNL-2994, **1960**, 272-273.

Mullin, J. M.; Weibel, J.; Diamond, L.; Kleinzeller, A. Sugar Transport in the LLC-PK1 Renal Epithelial Cell Line: Similarity to Mammalian Kidney and the Influence of Cell Density. *J. Cell Physiol* **1980**, *104*, 375-389.

Muntz J.A., Singer T.P., Barron E.S. Effect of uranium on the metabolism of yeast and bacteria. In : Tannenbaum, A., ed. Toxicology of uranium. National Nuclear Energy Series. Division IV. New York : Mc Graw-Hill **1951**, *23*, 246-261.

Murer, H.; Biber, J. Control of Proximal Tubular Apical Na/Pi Cotransport. *Exp. Nephrol.* **1996**, *4*, 201-204.

Murer, H.; Forster, I.; Hernando, N.; Lambert, G.; Traebert, M.; Biber, J. Posttranscriptional Regulation of the Proximal Tubule NaPi-II Transporter in Response to PTH and Dietary P(i). *Am. J. Physiol* **1999**, *277*, F676-F684.

Murphy, J. E.; Pleasure, I. T.; Puszkin, S.; Prasad, K.; Keen, J. H. Clathrin Assembly Protein AP-3. The Identity of the 155K Protein, AP 180, and NP185 and Demonstration of a Clathrin Binding Domain. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 4401-4408.

-N-

- Nagata, S. Apoptotic DNA Fragmentation. *Exp. Cell Res.* **2000**, *256*, 12-18.
- Natochin, Y. V.; Bakhteeva, V. T.; Karpenko, L. A. Renal Failure and Nephrotoxic Drug-Induced Disturbances in Rat Kidney Tissue. *Ren Fail.* **1994**, *16*, 687-696.
- Nelson, N. Structure and Function of V-ATPases in Endocytic and Secretory Organelles. *J. Exp. Biol.* **1992**, *172*, 149-153.
- Neuman W.F.; Flemming R.W.; Dounce A.I.; Carlson A.B.; O'Leary J.; Mulryan B. The distribution and excretion of injected uranium. *J. Biol. Chem.* **1948**, *173*, 737-748.
- Neuman W.F. The distribution and excretion of uranium. In : Pharmacology and Toxicology of uranium compounds. National Nuclear Energy, Series. Div. IV et VI. Mc Graw Mill Book Co, New York **1949**, *1*, 701-728.
- Neuman W.F. Deposition of uranium in bone. In : Pharmacology and Toxicology of uranium compounds. National Nuclear Energy, Series. Div. IV et VI Mc Graw Mill Book Co, New York. **1949**, *1*, 1911-1997
- Ni, B.; Rosteck, P. R., Jr.; Nadi, N. S.; Paul, S. M. Cloning and Expression of a cDNA Encoding a Brain-Specific Na(+)- Dependent Inorganic Phosphate Cotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1994**, *91*, 5607-5611.
- Ni, B.; Du, Y.; Wu, X.; DeHoff, B. S.; Rosteck, P. R., Jr.; Paul, S. M. Molecular Cloning, Expression, and Chromosomal Localization of a Human Brain-Specific Na(+)-Dependent Inorganic Phosphate Cotransporter. *J. Neurochem.* **1996**, *66*, 2227-2238.
- Nielsen, R.; Birn, H.; Moestrup, S. K.; Nielsen, M.; Verroust, P.; Christensen, E. I. Characterization of a Kidney Proximal Tubule Cell Line, LLC-PK1, Expressing Endocytotic Active Megalin. *J. Am. Soc. Nephrol.* **1998**, *9*, 1767-1776.
- Nielsen, R.; Sorensen, B. S.; Birn, H.; Christensen, E. I.; Nexø, E. Transcellular Transport of Vitamin B(12) in LLC-PK1 Renal Proximal Tubule Cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2001**, *12*, 1099-1106.
- Nizet, A. Influence of Uranyl Nitrate Upon Tubular Reabsorption and Glomerular Filtration in Blood Perfused Isolated Dog Kidneys. *Pflugers Arch.* **1981**, *391*, 296-300.
- Nomiyama, K.; Yamamoto, A.; Sato, C. Assay of Urinary Enzymes in Toxic Nephropathy. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1974**, *27*, 484-490.
- Nosseri, C.; Coppola, S.; Ghibelli, L. Possible Involvement of Poly(ADP-Ribosyl) Polymerase in Triggering Stress-Induced Apoptosis. *Exp. Cell Res.* **1994**, *212*, 367-373.

O'Hara, B.; Johann, S. V.; Klinger, H. P.; Blair, D. G.; Rubinson, H.; Dunn, K. J.; Sass, P.; Vitek, S. M.; Robins, T. Characterization of a Human Gene Conferring Sensitivity to Infection by Gibbon Ape Leukemia Virus. *Cell Growth Differ.* **1990**, *1*, 119-127.

Oberbauer, R.; Schreiner, G. F.; Biber, J.; Murer, H.; Meyer, T. W. In Vivo Suppression of the Renal Na<sup>+</sup>/Pi Cotransporter by Antisense Oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1996**, *93*, 4903-4906.

Ochoa, G. C.; Slepnev, V. I.; Neff, L.; Ringstad, N.; Takei, K.; Daniell, L.; Kim, W.; Cao, H.; McNiven, M.; Baron, R.; De Camilli, P. A Functional Link Between Dynamin and the Actin Cytoskeleton at Podosomes. *J. Cell Biol.* **2000**, *150*, 377-389.

Oda, H.; Stockert, R. J.; Collins, C.; Wang, H.; Novikoff, P. M.; Satir, P.; Wolkoff, A. W. Interaction of the Microtubule Cytoskeleton With Endocytic Vesicles and Cytoplasmic Dynein in Cultured Rat Hepatocytes.

Oh, P.; McIntosh, D. P.; Schnitzer, J. E. Dynamin at the Neck of Caveolae Mediates Their Budding to Form Transport Vesicles by GTP-Driven Fission From the Plasma Membrane of Endothelium. *J. Cell Biol.* **1998**, *141*, 101-114.

Ohno, H.; Stewart, J.; Fournier, M. C.; Bosshart, H.; Rhee, I.; Miyatake, S.; Saito, T.; Gallusser, A.; Kirchhausen, T.; Bonifacino, J. S. Interaction of Tyrosine-Based Sorting Signals With Clathrin-Associated Proteins. *Science* **1995**, *269*, 1872-1875.

Olah, Z.; Lehel, C.; Anderson, W. B.; Eiden, M. V.; Wilson, C. A. The Cellular Receptor for Gibbon Ape Leukemia Virus Is a Novel High Affinity Sodium-Dependent Phosphate Transporter. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 25426-25431.

Olson, J. L.; Rennke, H. G.; Venkatachalam, M. A. Alterations in the Charge and Size Selectivity Barrier of the Glomerular Filter in Aminonucleoside Nephrosis in Rats. *Lab Invest* **1981**, *44*, 271-279.

Otake A., Schull W. Mental retardation in children exposed in utero to the atomic bombs : A reassessment. Technical report RERF TR, Radiation Effects Research Foundation, Japon. **1984**, 1-83.

Owen, D. J.; Evans, P. R. A Structural Explanation for the Recognition of Tyrosine-Based Endocytotic Signals. *Science* **1998**, *282*, 1327-1332.

**-P-**

Palmer, G.; Bonjour, J. P.; Caverzasio, J. Expression of a Newly Identified Phosphate Transporter/Retrovirus Receptor in Human SaOS-2 Osteoblast-Like Cells and Its Regulation by Insulin-Like Growth Factor I. *Endocrinology* **1997**, *138*, 5202-5209.

Paquin, J.; Vincent, E.; Dugre, A.; Xiao, Y.; Boyer, C. J.; Beliveau, R. Membrane Topography of the Renal Phosphate Carrier NaPi-2: Limited Proteolysis Studies. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1431*, 315-328.

Paris, E. Hippocrates Meets Adam Smith. *Health Manage. Forum* **1986**, *7*, 70-74.

Park, C. H.; Maack, T. Albumin Absorption and Catabolism by Isolated Perfused Proximal Convoluted Tubules of the Rabbit. *J. Clin. Invest* **1984**, *73*, 767-777.

Parton, R. G. Ultrastructural Localization of Gangliosides; GM1 Is Concentrated in Caveolae. *J. Histochem. Cytochem.* **1994**, *42*, 155-166.

Parton, R. G.; Way, M.; Zorzi, N.; Stang, E. Caveolin-3 Associates With Developing T-Tubules During Muscle Differentiation. *J. Cell Biol.* **1997**, *136*, 137-154.

Pascal. Nouveau traité de chimie minérale. Tome XV, premier fascicule, eds. Masson, Paris. **1960**.

Pasquale, L.; Winiski, A.; Oliva, C.; Vaio, G.; McLaughlin, S. An Experimental Test of New Theoretical Models for the Electrokinetic Properties of Biological Membranes. The Effect of  $UO_2^{2+}$  and Tetracaine on the Electrophoretic Mobility of Bilayer Membranes and Human Erythrocytes. *J. Gen. Physiol* **1986**, *88*, 697-718.

Pasquier C. et Bourguignon M. Thérapeutique des contaminations par l'uranium. Contamination interne. CR 35A76, Trav. Scient. N°6, **1977**, 149-154.

Pasquier C. et Bourguignon M. Etude expérimentale de la fixation rénale après contamination aiguë par l'uranium. Influence de la solubilité des composés utilisés :  $UO_2^{2+}$ ,  $UO_3$ ,  $U_3O_8$ . IAEA-SM 237/29, Vienne. **1979**.

Pearse, B. M. Clathrin: a Unique Protein Associated With Intracellular Transfer of Membrane by Coated Vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1976**, *73*, 1255-1259.

Pedraza-Chaverri J., Cruz C., del Socorro Blancas M., Hernandez-Pando R., Ibarra-Rubio M.E., Larriva-Sahd J., Tapia E. Angiotensin I converting enzyme activity in uranyl nitrate induced acute renal failure in rats. *Ren. Fail.* **1995**, *17*, 377-388.

Pelham, H. R. Speculations on the Functions of the Major Heat Shock and Glucose-Regulated Proteins. *Cell* **1986**, *46*, 959-961.

Pelkmans, L.; Kartenbeck, J.; Helenius, A. Caveolar Endocytosis of Simian Virus 40 Reveals a New Two-Step Vesicular-Transport Pathway to the ER. *Nat. Cell Biol.* **2001**, *3*, 473-483.

Pellmar, T. C.; Fuciarelli, A. F.; Ejniak, J. W.; Hamilton, M.; Hogan, J.; Strocko, S.; Emond, C.; Mottaz, H. M.; Landauer, M. R. Distribution of Uranium in Rats Implanted With Depleted Uranium Pellets. *Toxicol. Sci.* **1999a**, *49*, 29-39.

Pellmar, T. C.; Keyser, D. O.; Emery, C.; Hogan, J. B. Electrophysiological Changes in Hippocampal Slices Isolated From Rats Embedded With Depleted Uranium Fragments. *Neurotoxicology* **1999b**, *20*, 785-792.

Pfister, M. F.; Ruf, I.; Stange, G.; Ziegler, U.; Lederer, E.; Biber, J.; Murer, H. Parathyroid Hormone Leads to the Lysosomal Degradation of the Renal Type II Na/Pi Cotransporter.

Pfister, M. F.; Forgo, J.; Ziegler, U.; Biber, J.; Murer, H. CAMP-Dependent and -Independent Downregulation of Type II Na-Pi Cotransporters by PTH.

Pfister, M. F.; Hilfiker, H.; Forgo, J.; Lederer, E.; Biber, J.; Murer, H. Cellular Mechanisms Involved in the Acute Adaptation of OK Cell Na/Pi- Cotransport to High- or Low-Pi Medium. *Pflugers Arch.* **1998**, *435*, 713-719.

Pfister, M. F.; Forgo, J.; Ziegler, U.; Biber, J.; Murer, H. CAMP-Dependent and -Independent Downregulation of Type II Na-Pi Cotransporters by PTH. *Am. J. Physiol* **1999**, *276*, F720-F725.

Pfister, M. F.; Brunskill, N. J.; Forgo, J.; Stange, G.; Biber, J.; Murer, H. Inhibition of Phosphatidylinositide 3-Kinase in OK-Cells Reduces Na/Pi- Cotransport but Does Not Interfere With Its Regulation by Parathyroid Hormone. *Pflugers Arch.* **1999**, *438*, 392-396.

Pitt, A.; Mayorga, L. S.; Schwartz, A. L.; Stahl, P. D. Transport of Phagosomal Components to an Endosomal Compartment. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 126-132.

Poirier J., Ribadeau-Dumas J.L. Histologie moléculaire. *Eds Masson, Paris* **1997**.

Portale, A. A.; Halloran, B. P.; Morris, R. C., Jr. Dietary Intake of Phosphorus Modulates the Circadian Rhythm in Serum Concentration of Phosphorus. Implications for the Renal Production of 1,25-Dihydroxyvitamin D. *J. Clin. Invest* **1987**, *80*, 1147-1154.

Poujeol, P.; Corman, B.; Touvy, C.; de Rouffignac, C. Phosphate Reabsorption in Rat Nephron Terminal Segments: Intrarenal Heterogeneity and Strain Differences. *Pflugers Arch.* **1977**, *371*, 39-44.

Poulik, M. D.; Gold, P.; Shuster, J. Beta 2-Microglobulin: Methods and Clinical Applications. *CRC Crit Rev. Clin. Lab Sci.* **1979**, *10*, 225-245.

Priest, N. D.; Howells, G. R.; Green, D.; Haines, J. W. Uranium in Bone: Metabolic and Autoradiographic Studies in the Rat. *Hum. Toxicol.* **1982**, *1*, 97-114.

Priest, N. D.; Howells, G.; Green, D.; Haines, J. W. Autoradiographic Studies of the Distribution of Radium-226 in Rat Bone: Their Implications for Human Radiation Dosimetry and Toxicity. *Hum. Toxicol.* **1983**, *2*, 479-496.

Priest, N. D.; Birchall, A. The Calculation of Bone Doses From Alpha-Emitting Bone Surface Seeking Radionuclides for Radiological Protection Purposes. *Radiat. Environ. Biophys.* **1984**, *23*, 149-153.

Priest, N. D.; Pich, G. M.; Fifield, L. K.; Cresswell, R. G. Accelerator Mass Spectrometry for the Detection of Ultra-Low Levels of Plutonium in Urine, Including That Excreted After the Ingestion of Irish Sea Sediments. *Radiat. Res.* **1999**, *152*, S16-S18.

Priest, N. D. Toxicity of Depleted Uranium. *Lancet* **2001**, *357*, 244-246.

-Q-

Quabius, E. S.; Murer, H.; Biber, J. Expression of a Renal Na/Pi Cotransporter (NaPi-1) in MDCK and LLC-PK1 Cells. *Pflugers Arch.* **1995**, *430*, 132-136.

Quabius, E. S.; Murer, H.; Biber, J. Expression of Proximal Tubular Na-Pi and Na-SO<sub>4</sub> Cotransporters in MDCK and LLC-PK1 Cells by Transfection. *Am. J. Physiol* **1996**, *270*, F220-F228.

Qualmann, B.; Kelly, R. B. Syndapin Isoforms Participate in Receptor-Mediated Endocytosis and Actin Organization.

Quamme, G.; Pfeilschifter, J.; Murer, H. Parathyroid Hormone Inhibition of Na<sup>+</sup>/Phosphate Cotransport in OK Cells: Intracellular [Ca<sup>2+</sup>] As a Second Messenger. *Biochim. Biophys.* **1989** .

Quamme, G.; Pfeilschifter, J.; Murer, H. Parathyroid Hormone Inhibition of Na<sup>+</sup>/Phosphate Cotransport in OK Cells: Generation of Second Messengers in the Regulatory Cascade. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *158*, 951-957.

Quamme, G.; Pfeilschifter, J.; Murer, H. Parathyroid Hormone Inhibition of Na<sup>+</sup>/Phosphate Cotransport in OK Cells: Requirement of Protein Kinase C-Dependent Pathway. *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *1013*, 159-165.

Quamme, G.; Pelech, S.; Biber, J.; Murer, H. Abnormalities of Parathyroid Hormone-Mediated Signal Transduction Mechanisms in Opossum Kidney Cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1223*, 107-116.

-R-

Rabito, C. A.; Karish, M. V. Polarized Amino Acid Transport by an Epithelial Cell Line of Renal Origin (LLC-PK1). The Basolateral Systems. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 6802-6808.

Rabito, C. A. Phosphate Uptake by a Kidney Cell Line (LLC-PK1). *Am. J. Physiol* **1983**, *245*, F22-F31.

Rabito, C. A. Occluding Junctions in a Renal Cell Line (LLC-PK1) With Characteristics of Proximal Tubular Cells. *Am. J. Physiol* **1986**, *250*, F734-F743.

Racoosin, E. L.; Swanson, J. A. Macropinosome Maturation and Fusion With Tubular Lysosomes in Macrophages. *J. Cell Biol.* **1993**, *121*, 1011-1020.

Razani, B.; Lisanti, M. P. Caveolins and Caveolae: Molecular and Functional Relationships. *Exp. Cell Res.* **2001**, *271*, 36-44.

Reshkin, S. J.; Forgo, J.; Murer, H. Functional Asymmetry in Phosphate Transport and Its Regulation in Opossum Kidney Cells: Parathyroid Hormone Inhibition. *Pflugers Arch.* **1990**, *416*, 624-631.

Reshkin, S. J.; Forgo, J.; Murer, H. Functional Asymmetry of Phosphate Transport and Its Regulation in Opossum Kidney Cells: Phosphate Transport. *Pflugers Arch.* **1990**, 554-560.

Reshkin, S. J.; Forgo, J.; Biber, J.; Murer, H. Functional Asymmetry of Phosphate Transport and Its Regulation in Opossum Kidney Cells: Phosphate "Adaptation". *Pflugers Arch.* **1991**, *419*, 256-262.

Reshkin, S. J.; Forgo, J.; Murer, H. Apical and Basolateral Effects of PTH in OK Cells: Transport Inhibition, Messenger Production, Effects of Pertussis Toxin, and Interaction With a PTH Analog. *J. Membr. Biol.* **1991**, *124*, 227-237.

Ribeiro, C. P.; Mandel, L. J. Parathyroid Hormone Inhibits Proximal Tubule Na(+)-K(+)-ATPase Activity. *Am. J. Physiol* **1992**, *262*, F209-F216.

Riccardi, D.; Hall, A. E.; Chattopadhyay, N.; Xu, J. Z.; Brown, E. M.; Hebert, S. C. Localization of the Extracellular Ca<sup>2+</sup>/Polyvalent Cation-Sensing Protein in Rat Kidney. *Am. J. Physiol* **1998**, *274*, F611-F622.

Rindler, M. J.; Chuman, L. M.; Shaffer, L.; Saier, M. H., Jr. Retention of Differentiated Properties in an Established Dog Kidney Epithelial Cell Line (MDCK). *J. Cell Biol.* **1979**, *81*, 635-648.

Ringstad, N.; Gad, H.; Low, P.; Di Paolo, G.; Brodin, L.; Shupliakov, O.; De Camilli, P. Endophilin/SH3p4 Is Required for the Transition From Early to Late Stages in Clathrin-Mediated Synaptic Vesicle Endocytosis. *Neuron* **1999**, *24*, 143-154.

Risso-de Faverney, C.; Devaux, A.; Lafaurie, M.; Girard, J. P.; Bailly, B.; Rahmani, R. Cadmium Induces Apoptosis and Genotoxicity in Rainbow Trout Hepatocytes Through Generation of Reactive Oxygene Species. *Aquat. Toxicol.* **2001**, *53*, 65-76.

Ritthaler, T.; Traebert, M.; Lotscher, M.; Biber, J.; Murer, H.; Kaissling, B. Effects of Phosphate Intake on Distribution of Type II Na/Pi Cotransporter mRNA in Rat Kidney. *Kidney Int.* **1999**, *55*, 976-983.

Robinson, J. M.; Kobayashi, T.; Seguchi, H.; Takizawa, T. Evaluation of Neutrophil Structure and Function by Electron Microscopy: Cytochemical Studies. *J. Immunol. Methods* **1999**, *232*, 169-178.

Robinson, P. J.; Sontag, J. M.; Liu, J. P.; Fykse, E. M.; Slaughter, C.; McMahon, H.; Sudhof, T. C. Dynamin GTPase Regulated by Protein Kinase C Phosphorylation in Nerve Terminals. *Nature* **1993**, *365*, 163-166.

Roth, A.; Nogues, C.; Galle, P.; Drueke, T. Multiorgan Aluminium Deposits in a Chronic Haemodialysis Patient. Electron Microscope and Microprobe Studies. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* **1984**, *405*, 131-140.

Rothberg, K. G.; Ying, Y. S.; Kamen, B. A.; Anderson, R. G. Cholesterol Controls the Clustering of the Glycophospholipid-Anchored Membrane Receptor for 5-Methyltetrahydrofolate. *J. Cell Biol.* **1990**, *111*, 2931-2938.

Rothberg, K. G.; Heuser, J. E.; Donzell, W. C.; Ying, Y. S.; Glenney, J. R.; Anderson, R. G. Caveolin, a Protein Component of Caveolae Membrane Coats. *Cell* **1992**, *68*, 673-682.

Roy, C.; Preston, A. S.; Handler, J. S. Insulin and Serum Increase the Number of Receptors for Vasopressin in a Kidney-Derived Line of Cells Grown in a Defined Medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1980**, *77*, 5979-5983.

Russell, J. J.; Kathren, R. L.; Dietert, S. E. A Histological Kidney Study of Uranium and Non-Uranium Workers. *Health Phys.* **1996**, *70*, 466-472.

-S-

Saleh, A.; Srinivasula, S. M.; Balkir, L.; Robbins, P. D.; Alnemri, E. S. Negative Regulation of the Apaf-1 Apoptosome by Hsp70.

Salim, K.; Bottomley, M. J.; Querfurth, E.; Zvelebil, M. J.; Gout, I.; Scaife, R.; Margolis, R. L.; Gigg, R.; Smith, C. I.; Driscoll, P. C.; Waterfield, M. D.; Panayotou, G. Distinct Specificity in the Recognition of Phosphoinositides by the Pleckstrin Homology Domains of Dynamin and Bruton's Tyrosine Kinase.

Salvesen, G. S.; Dixit, V. M. Caspase Activation: the Induced-Proximity Model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1999**, *96*, 10964-10967.

Sanchez, D. J.; Belles, M.; Albina, M. L.; Sirvent, J. J.; Domingo, J. L. Nephrotoxicity of Simultaneous Exposure to Mercury and Uranium in Comparison to Individual Effects of These Metals in Rats. *Biol. Trace Elem. Res.* **2001**, *84*, 139-154.

Sandeis C.L. Radiological health. Toxicological aspects of energy production. Columbus Ohio : Bartelle Press, **1986**, 253-284.

Sano, K.; Fujigaki, Y.; Ikegaya, N.; Ohishi, K.; Yonemura, K.; Hishida, A. The Roles of Apoptosis in Uranyl Acetate-Induced Acute Renal Failure. *Ren Fail.* **1998**, *20*, 697-701.

Sano, K.; Fujigaki, Y.; Miyaji, T.; Ikegaya, N.; Ohishi, K.; Yonemura, K.; Hishida, A. Role of Apoptosis in Uranyl Acetate-Induced Acute Renal Failure and Acquired Resistance to Uranyl Acetate. *Kidney Int.* **2000**, *57*, 1560-1570.

Sargiacomo, M.; Sudol, M.; Tang, Z.; Lisanti, M. P. Signal Transducing Molecules and Glycosyl-Phosphatidylinositol-Linked Proteins Form a Caveolin-Rich Insoluble Complex in MDCK Cells. **1993**.

Saxena, S.; Allon, M. The Role of Cytosolic Calcium in Chronic Adaptation to Phosphate Depletion in Opossum Kidney Cells. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 3902-3906.

Schentag, J. J.; Plaut, M. E. Patterns of Urinary Beta 2-Microglobulin Excretion by Patients Treated With Aminoglycosides. *Kidney Int.* **1980**, *17*, 654-661.

Scherer, P. E.; Lisanti, M. P.; Baldini, G.; Sargiacomo, M.; Mastick, C. C.; Lodish, H. F. Induction of Caveolin During Adipogenesis and Association of GLUT4 With Caveolin-Rich Vesicles. *J. Cell Biol.* **1994**, *12*, 1233-1243.

Schmid, S. L.; McNiven, M. A.; De Camilli, P. Dynamin and Its Partners: a Progress Report. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1998**, *10*, 504-512.

Schnitzer, J. E.; Oh, P.; Pinney, E.; Allard, J. Filipin-Sensitive Caveolae-Mediated Transport in Endothelium: Reduced Transcytosis, Scavenger Endocytosis, and Capillary Permeability of Select Macromolecules. *J. Cell Biol.* **1994**, *127*, 1217-1232.

Schnitzer, J. E.; Allard, J.; Oh, P. NEM Inhibits Transcytosis, Endocytosis, and Capillary Permeability: Implication of Caveolae Fusion in Endothelia. *Am. J. Physiol* **1995**, *268*, H48-H55.

Schnitzer, J. E.; Liu, J.; Oh, P. Endothelial Caveolae Have the Molecular Transport Machinery for Vesicle Budding, Docking, and Fusion Including VAMP, NSF, SNAP, Annexins, and GTPases. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 14399-14404.

Schwegler, J. S.; Heppelmann, B.; Mildenerger, S.; Silbernagl, S. Receptor-Mediated Endocytosis of Albumin in Cultured Opossum Kidney Cells: a Model for Proximal Tubular Protein Reabsorption. *Pflugers Arch.* **1991**, *418*, 383-392.

Schwiebert, E. M.; Mills, J. W.; Stanton, B. A. Actin-Based Cytoskeleton Regulates a Chloride Channel and Cell Volume in a Renal Cortical Collecting Duct Cell Line. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 7081-7089.

Sepulveda, F. V.; Mason, W. T. Single Channel Recordings Obtained From Basolateral Membranes of Isolated Rabbit Enterocytes. *FEBS Lett.* **1985**, *191*, 87-91.

Shen, L.; Lang, M. L.; Wade, W. F. The Ins and Outs of Getting in: Structures and Signals That Enhance BCR or Fc Receptor-Mediated Antigen Presentation. *Immunopharmacology* **2000**, *49*, 227-240.

Shin, J. S.; Gao, Z.; Abraham, S. N. Involvement of Cellular Caveolae in Bacterial Entry into Mast Cells. *Science* **2000**, *289*, 785-788.

Shpetner, H. S.; Vallee, R. B. Identification of Dynamin, a Novel Mechanochemical Enzyme That Mediates Interactions Between Microtubules. *Cell* **1989**, *59*, 421-432.

Shugrue, C. A.; Obermuller, N.; Bachmann, S.; Slayman, C. W.; Reilly, R. F. Molecular Cloning of NHE3 From LLC-PK1 Cells and Localization in Pig Kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* **1999**, *10*, 1649-1657.

Shurety, W.; Stewart, N. L.; Stow, J. L. Fluid-Phase Markers in the Basolateral Endocytic Pathway Accumulate in Response to the Actin Assembly-Promoting Drug Jasplakinolide. *Mol. Bi* **1998**.

Simmons, C. F., Jr.; Rennke, H. G.; Humes, H. D. Acute Renal Failure Induced by Diethylaminoethyl Dextran: Importance of Cationic Charge. *Kidney Int.* **1981**, *19*, 424-430.

Simpson, F.; Hussain, N. K.; Qualmann, B.; Kelly, R. B.; Kay, B. K.; McPherson, P. S.; Schmid, S. L. SH3-Domain-Containing Proteins Function at Distinct Steps in Clathrin-Coated Vesicle Formation. *Nat. Cell Biol.* **1999**, *1*, 119-124.

Singer T.P., Muntz J. A., Meyer J., Gasvoda B., Barron E.S. The reversible inhibition of enzymes by uranium. In : Tannenbaum, A., ed. Toxicology of uranium. National Nuclear Energy Series. Division IV. New York : McGraw-Hill : **1951**, *23*, 208-245.

Singh N.P., Burleigh D.P., Ruth H.M., Wrenn M.E. Daily uranium uptake in Utah residents from food and drinking water. *Health Phys.* **1990**, *59*, 333-337.

Smart, E. J.; Ying, Y. S.; Conrad, P. A.; Anderson, R. G. Caveolin Moves From Caveolae to the Golgi Apparatus in Response to Cholesterol Oxidation. *J. Cell Biol.* **1994**, *127*, 1185-1197.

Smart, E. J.; Ying, Y.; Donzell, W. C.; Anderson, R. G. A Role for Caveolin in Transport of Cholesterol From Endoplasmic Reticulum to Plasma Membrane. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 29427-29435.

Smart, E. J.; Graf, G. A.; McNiven, M. A.; Sessa, W. C.; Engelman, J. A.; Scherer, P. E.; Okamoto, T.; Lisanti, M. P. Caveolins, Liquid-Ordered Domains, and Signal Transduction. *Mol. Cell Biol.* **1999**, *19*, 7289-7304.

Sorribas, V.; Markovich, D.; Hayes, G.; Stange, G.; Forgo, J.; Biber, J.; Murer, H. Cloning of a Na/Pi Cotransporter From Opossum Kidney Cells. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 6615-6621.

Spitzenberger, F.; Graessler, J.; Schroeder, H. E. Identification of the Potential Sensitive Urate/PAH Transporter From LLC-PK1 Kidney Epithelial, Cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2000**, *486*, 175-178.

Stassen, F. L.; Heckman, G.; Schmidt, D.; Papadopoulos, M. T.; Nambi, P.; Sarau, H.; Aiyar, N.; Gellai, M.; Kinter, L. Oxytocin Induces a Transient Increase in Cytosolic Free [Ca<sup>2+</sup>] in Renal

Tubular Epithelial Cells: Evidence for Oxytocin Receptors on LLC-PK1 Cells. *Mol. Pharmacol.* **1988**, *33*, 218-224.

Stein, J. H.; Fried, T. A. Experimental Models of Nephrotoxic Acute Renal Failure. *Transplant. Proc.* **1985**, *17*, 72-80.

Stevens A., Lowe J. Histologie. *Eds Pradel* **1992**.

Stevens, W.; Bruenger, F. W.; Atherton, D. R.; Smith, J. M.; Taylor, G. N. The Distribution and Retention of Hexavalent <sup>233</sup>U in the Beagle. *Radiat. Res.* **1980**, *83*, 109-126.

Struxness E.G., Luissenhop A. J., Bernard S.R., Gallimere J.C. The distribution and excretion of hexavalent uranium in man. In : Proceedings of International Conference on the peaceful uses of atomic energy, New York : United Nations, **1956**, *10*, 186-195.

Sun, D. F.; Fujigaki, Y.; Fujimoto, T.; Yonemura, K.; Hishida, A. Possible Involvement of Myofibroblasts in Cellular Recovery of Uranyl Acetate-Induced Acute Renal Failure in Rats. *Am. J. Pathol.* **2000**, *157*, 1321-1335.

Sweitzer, S. M.; Hinshaw, J. E. Dynamin Undergoes a GTP-Dependent Conformational Change Causing Vesiculation. *Cell* **1998**, *93*, 1021-1029.

Szczepanska-Konkel, M.; Yusufi, A. N.; VanScoy, M.; Webster, S. K.; Dousa, T. P. Phosphonocarboxylic Acids As Specific Inhibitors of Na<sup>+</sup>-Dependent Transport of Phosphate Across Renal Brush Border Membrane. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 6375-6383.

-T-

Takei, K.; Haucke, V.; Slepnev, V.; Farsad, K.; Salazar, M.; Chen, H.; De Camilli, P. Generation of Coated Intermediates of Clathrin-Mediated Endocytosis on Protein-Free Liposomes. *Cell* **1998**, *94*, 131-141.

Tannenbaum A., Silverstone H., Koziol J. Tracer studies of the distribution and excretion of uranium in mice, rats and dogs. In : Toxicology of uranium, National Nuclear Energy, Series. Div. IV, McGraw Mill Book Co, New York, **1951**, *23*, 128-181

Tatsumi, S.; Segawa, H.; Morita, K.; Haga, H.; Kouda, T.; Yamamoto, H.; Inoue, Y.; Nii, T.; Katai, K.; Taketani, Y.; Miyamoto, K. I.; Takeda, E. Molecular Cloning and Hormonal Regulation of PiT-1, a Sodium-Dependent Phosphate Cotransporter From Rat Parathyroid Glands. *Endocrinology* **1998**, *13*, 1692-1699.

Tatsumi, S.; Miyamoto, K.; Kouda, T.; Motonaga, K.; Katai, K.; Ohkido, I.; Morita, K.; Segawa, H.; Tani, Y.; Yamamoto, H.; Taketani, Y.; Takeda, E. Identification of Three Isoforms for the Na<sup>+</sup>-Dependent Phosphate Cotransporter (NaPi-2) in Rat Kidney. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 28568-28575.

Tebar, F.; Bohlander, S. K.; Sorkin, A. Clathrin Assembly Lymphoid Myeloid Leukemia (CALM) Protein: Localization in Endocytic-Coated Pits, Interactions With Clathrin, and the Impact of Overexpression on Clathrin-Mediated Traffic. *Mol. Biol. Cell* **1999**, *10*, 2687-2702.

Tenenhouse, H. S.; Gauthier, C.; Martel, J.; Gesek, F. A.; Coutermarsh, B. A.; Friedman, P. A. Na<sup>+</sup> -Phosphate Cotransport in Mouse Distal Convolute Tubule Cells: Evidence for Glvr-1 and Ram-1 Gene Expression. **199**.

Tenenhouse, H. S.; Gauthier, C.; Martel, J.; Gesek, F. A.; Coutermarsh, B. A.; Friedman, P. A. Na<sup>+</sup> -Phosphate Cotransport in Mouse Distal Convolute Tubule Cells: Evidence for Glvr-1 and Ram-1 Gene Expression. *J. Bone Miner. Res.* **1998**, *13*, 590-597.

Tenenhouse, H. S.; Roy, S.; Martel, J.; Gauthier, C. Differential Expression, Abundance, and Regulation of Na<sup>+</sup>-Phosphate Cotransporter Genes in Murine Kidney. *Am. J. Physiol* **1998**, *275*, F527-F534.

Terepka A.R., Toribara T.Y., Neuman W.F. Skeletal retention of uranium in man. Abstract 22, 46<sup>th</sup> meeting of the endocrine society. San Francisco CA. **1964**.

Thatte, H. S.; Bridges, K. R.; Golan, D. E. Microtubule Inhibitors Differentially Affect Translational Movement, Cell Surface Expression, and Endocytosis of Transferrin Receptors in K562 Cells. *J. Cell Physiol* **1994**, *160*, 345-357.

Thompson R.C. Life-Span Effects of Ionizing Radiation in the Beagle dog. Battelle Pacific Northwest Laboratory PNL-6822, UC-408. **1989**.

Thomsen, P.; Roepstorff, K.; Stahlhut, M.; van Deurs, B. Caveolae Are Highly Immobile Plasma Membrane Microdomains, Which Are Not Involved in Constitutive Endocytic Trafficking. *Mol. Biol. Cell* **2002**, *13*, 238-250.

Thornberry, N. A.; Lazebnik, Y. Caspases: Enemies Within. *Science* **1998**, *281*, 1312-1316.

Thun, M. J.; Baker, D. B.; Steenland, K.; Smith, A. B.; Halperin, W.; Berl, T. Renal Toxicity in Uranium Mill Workers. *Scand. J. Work Environ. Health* **1985**, *11*, 83-90.

Tomoda, H.; Kishimoto, Y.; Lee, Y. C. Temperature Effect on Endocytosis and Exocytosis by Rabbit Alveolar Macrophages. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 15445-15450.

Toutain, H.; Morin, J. P. Renal Proximal Tubule Cell Cultures for Studying Drug-Induced Nephrotoxicity and Modulation of Phenotype Expression by Medium Components. *Ren Fail.* **1992**, *14*, 371-383.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* **1992**, *24*, 145-149.

Traebert, M.; Volkl, H.; Biber, J.; Murer, H.; Kaissling, B. Luminal and Contraluminal Action of 1-34 and 3-34 PTH Peptides on Renal Type IIa Na-P(i) Cotransporter.

Traebert, M.; Hattenhauer, O.; Murer, H.; Kaissling, B.; Biber, J. Expression of Type II Na-P(i) Cotransporter in Alveolar Type II Cells. *Am. J. Physiol* **1999**, *277*, L868-L873.

Traebert, M.; Roth, J.; Biber, J.; Murer, H.; Kaissling, B. Internalization of Proximal Tubular Type II Na-P(i) Cotransporter by PTH: Immunogold Electron Microscopy. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **2000**, *278*, F148-F154.

Tyrakowski, T.; Knapowski, J.; Baczyk, K. Disturbances in Electrolyte Transport Before the Onset of Uranyl Acetate-Induced Renal Failure. *Kidney Int. Suppl* **1976**, *6*, S144-S152.

-U-

Ueda, K.; Okamura, N.; Hirai, M.; Tanigawara, Y.; Saeki, T.; Kioka, N.; Komano, T.; Hori, R. Human P-Glycoprotein Transports Cortisol, Aldosterone, and Dexamethasone, but Not Progesterone. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 24248-24252.

Uehara, K.; Miyoshi, M. Tubular Invaginations With Caveolae and Coated Pits in the Sinus Endothelial Cells of the Rat Spleen. *Histochem. Cell Biol.* **1999**, *112*, 351-358.

Uittenbogaard, A.; Ying, Y.; Smart, E. J. Characterization of a Cytosolic Heat-Shock Protein-Caveolin Chaperone Complex. Involvement in Cholesterol Trafficking.

Uittenbogaard, A.; Smart, E. J. Palmitoylation of Caveolin-1 Is Required for Cholesterol Binding, Chaperone Complex Formation, and Rapid Transport of Cholesterol to Caveolae. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 25595-25599.

Ungewickell, E.; Branton, D. Assembly Units of Clathrin Coats. *Nature* **1981**, *289*, 420-422.

Ungewickell, E.; Ungewickell, H.; Holstein, S. E.; Lindner, R.; Prasad, K.; Barouch, W.; Martin, B.; Greene, L. E.; Eisenberg, E. Role of Auxilin in Uncoating Clathrin-Coated Vesicles. *Nature* **1995**, *378*, 632-635.

Ungewickell, E. Wrapping the Package. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1999**, *96*, 8809-8810.

-V-

Van der Blik, A. M.; Meyerowitz, E. M. Dynamin-Like Protein Encoded by the *Drosophila* Shibire Gene Associated With Vesicular Traffic. *Nature* **1991**, *351*, 411-414.

Van Zeijl, M.; Johann, S. V.; Closs, E.; Cunningham, J.; Eddy, R.; Shows, T. B.; O'Hara, B. A. Human Amphotropic Retrovirus Receptor Is a Second Member of the Gibbon Ape Leukemia Virus Receptor Family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1994**, *91*, 1168-1172.

Vasile, E.; Qu, H.; Dvorak, H. F.; Dvorak, A. M. Caveolae and Vesiculo-Vacuolar Organelles in Bovine Capillary Endothelial Cells Cultured With VPF/VEGF on Floating Matrigel-Collagen Gels. *J. Histochem. Cytochem.* **1999**, 159-167.

Vayssier, M.; Banzet, N.; Francois, D.; Bellmann, K.; Polla, B. S. Tobacco Smoke Induces Both Apoptosis and Necrosis in Mammalian Cells: Differential Effects of HSP70. *Am. J. Physiol* **1998**, *275*, L771-L779.

Veldman, C. M.; Markovich, D.; Schmid, C.; Murer, H. Expression of Sodium-Dependent Phosphate (NaPi) Transport in *Xenopus Laevis* Oocytes Induced by mRNA From 1 Alpha, 25-Dihydroxyvitamin D3- Treated Rat Osteoblast-Like Cells.

Verri, T.; Markovich, D.; Perego, C.; Norbis, F.; Stange, G.; Sorribas, V.; Biber, J.; Murer, H. Cloning of a Rabbit Renal Na-Pi Cotransporter, Which Is Regulated by Dietary Phosphate. *Am. J. Physiol* **1995**, *268*, F626-F633.

Verroust, P. J.; Kozyraki, R. The Roles of Cubilin and Megalin, Two Multiligand Receptors, in Proximal Tubule Function: Possible Implication in the Progression of Renal Disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **2001**, *10*, 33-38.

Voegtlin C., Hodge H. C. eds, Pharmacology and toxicology of uranium compounds. National nuclear Energy Series. Div. IV, Parts I and II. New York : Mc Graw-Hill. **1949**, 1.

Voegtlin C., Hodge H. C. eds, Pharmacology and toxicology of uranium compounds. National Nuclear Energy Series. Div. VI, Parts III and IV. New York : Mc Graw-Hill. **1953**, 1.

**-W-**

Wagner, C. A.; Waldegger, S.; Osswald, H.; Biber, J.; Murer, H.; Busch, A. E.; Lang, F. Heavy Metals Inhibit Pi-Induced Currents Through Human Brush-Border NaPi-3 Cotransporter in *Xenopus* Oocytes. *Am. J. Physiol* **1996**, *271*, F926-F930.

Wall, D. A.; Maack, T. Endocytic Uptake, Transport, and Catabolism of Proteins by Epithelial Cells. *Am. J. Physiol* **1985**, *248*, C12-C20.

Wang, L. H.; Rothberg, K. G.; Anderson, R. G. Mis-Assembly of Clathrin Lattices on Endosomes Reveals a Regulatory Switch for Coated Pit Formation. *J. Cell Biol.* **1993**, *123*, 1107-1117.

Waqar, M. A.; Seto, J.; Chung, S. D.; Hiller-Grohol, S.; Taub, M. Phosphate Uptake by Primary Renal Proximal Tubule Cell Cultures Grown in Hormonally Defined Medium. *J. Cell Physiol* **1985**, *124*, 411-423.

Watts, C.; Marsh, M. Endocytosis: What Goes in and How? *J. Cell Sci.* **1992**, *103 ( Pt 1)*, 1-8.

Weber, T. J.; Monks, T. J.; Lau, S. S. PGE<sub>2</sub>-Mediated Cytoprotection in Renal Epithelial Cells: Evidence for a Pharmacologically Distinct Receptor. *Am. J. Physiol* **1997**, *273*, F507-F515.

Weening, J. J.; Rennke, H. G. Glomerular Permeability and Polyanion in Adriamycin Nephrosis in the Rat. *Kidney Int.* **1983**, *24*, 152-159.

Wei, S.; Tanaka, H.; Seino, Y. Local Action of Exogenous Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor- I on Dihydroxyvitamin D Production in LLC-PK1 Cells. *Eur. J. Endocrinol.* **1998**, *139*, 454-460.

Weinberg J.M. The cellular basis of nephrotoxicity. In : Schrider R.W., Gottschalk C.W, eds. Diseases of the kidney. Boston : Little, Brown, and Co. **1988** , 1137-1195.

Weinman, E. J.; Steplock, D.; Wang, Y.; Shenolikar, S. Characterization of a Protein Cofactor That Mediates Protein Kinase A Regulation of the Renal Brush Border Membrane Na(+)-H+ Exchanger. *J. Clin. Invest* **1995**, *95*, 2143-2149.

Wenzel, U.; Diehl, D.; Herget, M.; Daniel, H. Endogenous Expression of the Renal High-Affinity H<sup>+</sup>-Peptide Cotransporter in LLC-PK1 Cells. *Am. J. Physiol* **1998**, *275*, C1573-C1579.

Werner, A.; Moore, M. L.; Mantei, N.; Biber, J.; Semenza, G.; Murer, H. Cloning and Expression of cDNA for a Na/Pi Cotransport System of Kidney Cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1991**, *88*, 9608-9612.

Wesp, A.; Hicke, L.; Palecek, J.; Lombardi, R.; Aust, T.; Munn, A. L.; Riezman, H. End4p/Sla2p Interacts With Actin-Associated Proteins for Endocytosis in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **1997**, *8*, 2291-2306.

White, K. E.; Biber, J.; Murer, H.; Econs, M. J. A PDZ Domain-Containing Protein With Homology to Diphor-1 Maps to Human Chromosome 1q21. *Ann. Hum. Genet.* **1998**, *62 ( Pt 4)*, 287-290.

Wigge, P.; Vallis, Y.; McMahon, H. T. Inhibition of Receptor-Mediated Endocytosis by the Amphiphysin SH3 Domain. *Curr. Biol.* **1997**, *7*, 554-560.

Wileman, T.; Harding, C.; Stahl, P. Receptor-Mediated Endocytosis. *Biochem. J.* **1985**, *232*, 1-14.

Willingham, M. C.; Yamada, S. S. A Mechanism for the Destruction of Pinosomes in Cultured Fibroblasts. Piranhaolysis. *J. Cell Biol.* **1978**, *78*, 480-487.

Wolf, G.; Zahner, G.; Mondorf, U.; Schoeppe, W.; Stahl, R. A. Angiotensin II Stimulates Cellular Hypertrophy of LLC-PK1 Cells Through the AT1 Receptor. *Nephrol. Dial. Transplant.* **1993**, *8*, 128-133.

Woscholski, R.; Finan, P. M.; Radley, E.; Totty, N. F.; Sterling, A. E.; Hsuan, J. J.; Waterfield, M. D.; Parker, P. J. Synaptojanin Is the Major Constitutively Active Phosphatidylinositol- 3,4,5-Trisphosphate 5-Phosphatase in Rodent Brain. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 9625-9628.

Woscholski, R.; Finan, P. M.; Radley, E.; Totty, N. F.; Sterling, A. E.; Hsuan, J. J.; Waterfield, M. D.; Parker, P. J. Synaptojanin Is the Major Constitutively Active Phosphatidylinositol- 3,4,5-Trisphosphate 5-Phosphatase in Rodent Brain. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 9625-9628.

Wrenn, M. E.; Durbin, P. W.; Howard, B.; Lipsztein, J.; Rundo, J.; Still, E. T.; Willis, D. L. Metabolism of Ingested U and Ra. *Health Phys.* **1985**, *48*, 601-633.

-X-

Xie, Q. [Nursing Coordination for Total Anomalous Pulmonary Venous Connection]. *Zhonghua Hu Li Za Zhi.* **1996**, *31*, 451-452.

Xie, X. S.; Stone, D. K. Isolation and Reconstitution of the Clathrin-Coated Vesicle Proton Translocating Complex. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 2492-2495.

-Y-

Yabuuchi, H.; Tamai, I.; Morita, K.; Kouda, T.; Miyamoto, K.; Takeda, E.; Tsuji, A. Hepatic Sinusoidal Membrane Transport of Anionic Drugs Mediated by Anion Transporter Npt1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, *286*, 1391-1396.

Ye, W.; Lafer, E. M. Bacterially Expressed F1-20/AP-3 Assembles Clathrin into Cages With a Narrow Size Distribution: Implications for the Regulation of Quantal Size During Neurotransmission. *J. Neurosci. Res.* **1995**, *41*, 15-26.

Yuile C.L. Animal experiments. In : Hodge H.C., Stannard J. N., Mursh J.B., eds. Uranium, plutonium, transplutanic elements : Handbook of experimental pharmacology, XXXVI, Springer-Verlag, Heidelberg, **1973**, 165-196.

**-Z-**

Zalups, R. K.; Gelein, R. M.; Morrow, P. E.; Diamond, G. L. Nephrotoxicity of Uranyl Fluoride in Uninephrectomized and Sham- Operated Rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1988**, *94*, 11-22.

Zalups, R. K. Molecular Interactions With Mercury in the Kidney. *Pharmacol. Rev.* **2000**, *52*, 113-143.

Zamora, M. L.; Tracy, B. L.; Zielinski, J. M.; Meyerhof, D. P.; Moss, M. A. Chronic Ingestion of Uranium in Drinking Water: a Study of Kidney Bioeffects in Humans. *Toxicol. Sci.* **1998**, *43*, 68-77.

Zhao, N.; Tenenhouse, H. S. Npt2 Gene Disruption Confers Resistance to the Inhibitory Action of Parathyroid Hormone on Renal Sodium-Phosphate Cotransport. *Endocrinology* **2000**, *141*, 2159-2165.

Zhou, S.; Tannery, N. H.; Yang, J.; Puszkin, S.; Lafer, E. M. The Synapse-Specific Phosphoprotein F1-20 Is Identical to the Clathrin Assembly Protein AP-3. *J. Biol. Chem.* **1993**, 12655-12662.

Zou, H.; Henzel, W. J.; Liu, X.; Lutschg, A.; Wang, X. Apaf-1, a Human Protein Homologous to *C. Elegans* CED-4, Participates in Cytochrome C-Dependent Activation of Caspase-3. *Cell* **1997**, *90*, 405-413.

## PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

### Publications :

#### Article 1 (soumis):

**Titre :** Role of clathrin-mediated endocytosis towards uranium uptake and toxicity in LLC-PK<sub>1</sub> cells.

**Auteurs :** <sup>1</sup>*Muller Dany*, <sup>2</sup>*HENGE-NAPOLI Marie-Hélène*, <sup>1</sup>*HOUPERT Pascale*, <sup>3</sup>*CAMBAR Jean*.

<sup>1</sup>IRSN/DPHD/SDOS/LEAR – BP 166, Site nucléaire du Tricastin, CEN Valrhô, 26702 Pierrelatte cédex, France.

<sup>2</sup>CEA, DEN Valrhô – Dir – CVAR, BP 17171, 30130 Bagnols sur Cèze cédex, France.

<sup>3</sup>GEPPR, Faculté des sciences pharmaceutiques, 146 rue léo Saignat, 33076 Bordeaux cédex, France.

#### Article 2 (correction en cours):

**Titre :** Uranium-induced cytotoxicity in LLC-PK<sub>1</sub> and MDCK cells is mediated by the sodium-dependent phosphate co-transporters.

**Auteurs :** <sup>1</sup>*Muller Dany*, <sup>2</sup>*HENGE-NAPOLI Marie-Hélène*, <sup>1</sup>*HOUPERT Pascale*, <sup>3</sup>*CAMBAR Jean*.

<sup>1</sup>IRSN/DPHD/SDOS/LEAR – BP 166, Site nucléaire du Tricastin, CEN Valrhô, 26702 Pierrelatte cédex, France.

<sup>2</sup>CEA, DEN Valrhô – Dir – CVAR, BP 17171, 30130 Bagnols sur Cèze cédex, France.

<sup>3</sup>GEPPR, Faculté des sciences pharmaceutiques, 146 rue léo Saignat, 33076 Bordeaux cédex, France.

### **Article 3 (soumis):**

**Titre** : Etude de la toxicité combinée de l'uranium et du DTPA sur des cellules rénales en culture..

**Auteurs** : <sup>1</sup>*Muller Dany*, <sup>2</sup>*HENGE-NAPOLI Marie-Hélène*, <sup>1</sup>*HOUPERT Pascale*,  
<sup>3</sup>*CAMBAR Jean*.

<sup>1</sup>IRSN/DPHD/SDOS/LEAR – BP 166, Site nucléaire du Tricastin, CEN Valrhô, 26702 Pierrelatte  
cédex, France.

<sup>2</sup>CEA, DEN Valrhô – Dir – CVAR, BP 17171, 30130 Bagnols sur Cèze cédex, France.

<sup>3</sup>GEPPR, Faculté des sciences pharmaceutiques, 146 rue léo Saignat, 33076 Bordeaux cédex,  
France.

### **Article 4 (en cours d'écriture) :**

**Titre** : Uranium induces apoptosis in LLC-PK<sub>1</sub> and MDCK cells via the sodium-  
dependent phosphate co-transporters.

**Auteurs** : <sup>1</sup>*Muller Dany*, <sup>2</sup>*HENGE-NAPOLI Marie-Hélène*, <sup>1</sup>*HOUPERT Pascale*,  
<sup>3</sup>*CAMBAR Jean*.

<sup>1</sup>IRSN/DPHD/SDOS/LEAR – BP 166, Site nucléaire du Tricastin, CEN Valrhô, 26702 Pierrelatte  
cédex, France.

<sup>2</sup>CEA, DEN Valrhô – Dir – CVAR, BP 17171, 30130 Bagnols sur Cèze cédex, France.

<sup>3</sup>GEPPR, Faculté des sciences pharmaceutiques, 146 rue léo Saignat, 33076 Bordeaux cédex,  
France.

## **Communications :**

### **Présentation orale :**

- Journée des thèses IRSN - septembre 1999. INSTN : Centre d'études de Saclay.
- Journée des thèses IRSN - septembre 2000. Maison de chimie de Paris.
- Journée des thèses IRSN - septembre 2001. Ecole de Chimie de Paris

- Journée des thèses IRSN - septembre 2002. INSTN : centre d'études de Cadarache.

**Poster :**

- **L'endocytose clathrine-dépendante : voie principale de transport de l'uranium.**

Journée des thèses organisée par l'Ecole Doctorale Bordeaux 2 - (Avril 2001)

- **Chimiotoxicité de l'uranium : quel rôle pour l'endocytose ?**

Congrès : Colloque de la Société de Pharmacotoxicologie Cellulaire (SPTC - 27 et 28 Septembre 2001).

- **Toxicité de l'uranium : rôle du co-transporter NaPi-II.**

Journée des thèses organisée par l'Ecole Doctorale Bordeaux 2 – (Avril 2002).

- **Uranium induces apoptosis *in vitro* via the sodium-dependent phosphate co-transporters.**

Congrès : Workshop of the European Society of Toxicology In Vitro (ESTIV). INVITOX 2002 (du 16 au 19 octobre 2002).

.

**ANNEE** : 2002

**Auteur** : MULLER Dany

**UNIVERSITE VICTOR SEGALEN – BORDEAUX 2**

---

**ETUDE *IN VITRO* DE LA REABSORPTION TUBULAIRE PROXIMALE DE  
L'URANIUM – CONSEQUENCES FONCTIONNELLES.**

---

L'uranium étant *in fine* accumulé au sein des lysosomes des cellules tubulaires proximales, il est probable que l'endocytose soit le processus de transport de cet élément. Nous avons cherché à déterminer, lors de cette étude, quelle pouvait être son implication vis-à-vis de l'absorption de l'actinide et de la toxicité induite.

La caractérisation des paramètres cinétiques de l'absorption de l'uranium par les cellules LLC-PK<sub>1</sub>, d'origine tubulaire proximale, montre que le système principal de transport est saturable ( $V_m = 16.95 \pm 0.92$  pmol/mg prot./h), l'affinité apparente étant de  $1.105 \pm 0.175$   $\mu$ mol/l. De manière similaire au processus endocytique clathrine-dépendant, ce système de transport est un processus actif, dépendant de l'intégrité du cytosquelette et de l'état d'activation de PKC. L'absorption de l'uranium est ainsi respectivement réduite 85.9, 35.9, 56.8 et 46.6% lorsque les cellules sont incubées à 4°C pendant 1 heure ou pré-traitées avec 1  $\mu$ mol/l de colchicine, 0.5  $\mu$ mol/l de cytochalasine D et 10 nmol/l de PMA. Il est également inhibé de 45.1% par 10  $\mu$ mol/l de chlorpromazine et de 83.9% lorsque les études sont effectuées en milieu hypertonique. Cette inhibition s'accompagne cependant d'une potentialisation de la cytotoxicité de l'actinide.

Nos travaux montrent que cet effet résulte de stimulation du transport sodium-dépendant du phosphate (NaPi), et réciproquement, que son inhibition supprime la toxicité de l'uranium. Ces observations sont confirmées lorsque les études sont conduites sur le modèle cellulaire MDCK, d'origine tubulaire distale, transfecté avec l'ADNc codant pour le co-transporteur rNaPi-2. La sur-expression du co-transporteur stimule l'activité de transport du phosphate d'un facteur 4 et la cytotoxicité de l'uranium d'un facteur 3.

Nous suggérons donc que l'endocytose clathrine-dépendante est le mécanisme cellulaire principal de l'absorption de l'uranium, et que les co-transporteurs NaPi transportent la fraction cytotoxique de l'actinide.

---

**DISCIPLINE** : Sciences Biologiques et Médicales.

---

**MOTS CLES** : uranium -culture cellulaire - endocytose - NaPi co-transporteurs - cytotoxicité - LLC-PK<sub>1</sub> - MDCK - systèmes de transport - reins.

---

**Adresse du laboratoire** : IRSN/DPHD/SDOS – Laboratoire d'Etudes Appliquées en Radiotoxicologie (LEAR). Site Nucléaire du Tricastin – CEN Valrhô – BP 166 – 26702 Pierrelatte cédex.