

ETUDE AUTORADIOGRAPHIQUE DE LA REPARTITION DE L'HISTAMINE ^{14}C ET DE SES METABOLITES DANS LE REIN DE RAT

J. C. SCHWARTZ, Y. COHEN et G. VALETTE

Laboratoire de Pharmacodynamie, Faculté de Pharmacie de Paris et C.E.A.

(Received 18 September 1965; accepted 7 October 1965)

Abstract—Renal autoradiographic studies and kidney cortex radioactivity analysis performed in the rat after intravenous administration of ^{14}C histamine have shown that the end part of the proximal tubule is probably involved in the renal uptake of histamine. As the uptake in the inner cortical zone is not suppressed by 'stop flow' conditions, it is concluded that it represents the first stage in a tubular secretion process.

Localization of radioactivity in the outer cortical zone occurs only after extensive catabolism of the histamine in the body is suppressed in aminoguanidine treated animals and therefore this last localization seems to be related to acid products of histamine catabolism.

LA FUGACITÉ de l'effet pharmacologique d'une injection d'histamine ne peut être attribuée à la seule dégradation enzymatique. L'amine est, en effet, rapidement extraite du compartiment vasculaire par différents organes qui la captent de façon labile et transitoire: cette captation n'est pas suivie d'une fixation durable mais semble préluder à la dégradation enzymatique intracellulaire ou encore, dans le cas du rein, à l'excrétion urinaire. C'est ce dernier organe qui, chez le Rat, semble le plus actif dans ce processus de captation puisque, quelques minutes après l'injection, on y retrouve la plus forte concentration d'histamine.^{1, 2}

Le rôle du rein dans l'inactivation de l'histamine a été plus spécialement étudié chez le Chien par Valette *et coll.*^{3, 4} et chez le Chat par Emmelin⁵ et Lindell *et coll.*⁶ Ces auteurs ont mis en évidence que seule une faible proportion de l'histamine injectée dans l'artère rénale parvient dans la circulation générale ou dans l'urine à la suite de la forte dégradation enzymatique qui s'effectue dans le rein.

La rapidité de cette dégradation, qui résulte à la fois de l'action des enzymes oxydatifs et méthylant,⁷ complique l'analyse du mécanisme d'excrétion urinaire de l'histamine. C'est ainsi que Lindahl *et coll.*,^{8, 9} utilisant la technique qui met à profit la circulation porte rénale du Poulet, concluent que l'histamine subit une excretion tubulaire active. Mais en l'absence de données sur le catabolisme de l'amine chez cette espèce, l'interprétation de l'expérience est discutable, d'autant plus que les auteurs ne parviennent pas à "saturer" par de fortes doses le mécanisme de transport invoqué. Néanmoins, la forte inhibition de l'excrétion urinaire d'histamine que provoque la tolazoline, un produit du groupe des bases organiques subissant une excretion tubulaire active¹⁰, suggère que l'histamine pourrait faire partie de ce même groupe.

Par ailleurs, Lindell *et coll.*¹¹ montrent que l'extraction rénale de l'histamine ^{14}C

chez le Chien est d'environ 80 pour cent, c'est-à-dire voisine de celle de l'acide para amino hippuripue. Mais, malgré cette valeur élevée du taux d'extraction, ils rejettent l'hypothèse d'une excrétion tubulaire. En effet, à la suite d'une importante dégradation enzymatique dans le rein, seule une faible proportion d'histamine apparaît dans l'urine et il en résulte que la clearance du produit, calculée de la façon habituelle, est faible.

Ainsi, à la suite de ces différents travaux et compte tenu de l'hétérogénéité de l'organe, il restait à identifier la région du rein responsable de l'extraction de l'histamine circulante et à préciser le mécanisme de l'excrétion urinaire. Nous avons abordé cette étude chez le Rat par autoradiographies pratiquées successivement sur différents groupes d'animaux: normaux, en diurèse interrompue et, enfin, prétraités par l'aminoguanidine, un inhibiteur de l'histaminase.

METHODES

Les rats Wistar normaux, mâles, de 220 à 280 g, légèrement anesthésiés par l'éther, reçoivent une injection d'histamine ^{14}C (Amersham, G. B.) dans la veine du pénis à raison de 5 μc , soit 125 μg , dans 0,5 ml de soluté physiologique. Après respectivement 2, 5, 15 ou 30 min, ils sont sacrifiés par section des carotides et les reins, prélevés à la suite d'une large laparatomie, sont immédiatement plongés dans un vase Dewar contenant de l'acétone refroidie à -78° par la neige carbonique.

Les autoradiographies de coupes longitudinales pratiquées au niveau du pédicule rénal sont obtenues suivant la technique de Ullberg¹² modifiée par Cohen et Delassus.¹³

Pour les autoradiographies en diurèse interrompue, l'arrêt unilatéral de la diurèse a été obtenue suivant un protocole inspiré de celui de Williamson *et coll.*¹⁴ Le rat est anesthésié par injection intrapéritonéale de 0,25 ml d'une solution de pentobarbital sodique à 50 mg/ml. Une canule est mise en place dans la veine jugulaire puis reliée par un tube en polythène à la seirngue d'une pompe à perfusion. On établit, à la vitesse de 0,4 ml/min une injection continue d'une solution isotonique de NaCl contenant 20 pour cent de mannitol. Environ 20 minutes après le début de la perfusion, on pratique une laparatomie médiane et extériorise l'uretère gauche qu'on lie solidement à l'aide d'un fil disposé à une distance de 1 cm du rein. Dix minutes exactement après la ligature de l'uretère, la filtration glomérulaire étant supposée arrêtée dans le rein gauche, on injecte dans le tube en polythène relié à la jugulaire 125 μg de bichlorhydrate d'histamine ^{14}C en solution dans 0,5 ml de soluté isotonique. Cinq minutes après cette injection, la perfusion est arrêtée et les deux reins sont prélevés et plongés dans l'acétone refroidie par la carboglace. L'uretère gauche a été sectionné en aval de la ligature afin de maintenir l'occlusion. Les autoradiogrammes des deux reins sont alors préparés comme précédemment.

Dans un troisième groupe d'animaux, l'effet de l'inhibition de l'histaminase a été étudié en administrant aux rats, 6 h avant l'injection d'histamine ^{14}C , 20 mg/kg d'aminoguanidine par voie sous-cutanée puis, 30 min avant cette injection, une nouvelle dose de 10 mg/kg par voie intrapéritonéale. Les autoradiographies de rein ont alors été effectuées sur des rats sacrifiés 5, 15 et 30 min après l'injection d'histamine ^{14}C .

L'identification de la radioactivité captée par le rein des animaux normaux est faite en évaluant, sur un même extrait trichloracétique d'organe, le ^{14}C total par scintillation liquide et l'histamine ^{14}C par dilution isotopique.

Le mélange scintillant utilisé est une solution à 0,4 p. 100 de diphenyl 2-5 oxazole

et à 0,01 p. 100 de di(phényl-2-oxazolyl)5-benzène-1-4 dans le toluène. A 11,2 ml de cette solution on ajoute 3,7 ml d'éthanol ce qui permet d'incorporer au mélange jusqu'à 0,2 ml de solution aqueuse radioactive. Le comptage est effectué dans le Tracerlab LSC-10 B et le résultat est corrigé du mouvement propre et de l'auto-extinction éventuelle.

Le dosage sélectif de l'histamine ^{14}C par dilution isotopique a été effectué suivant la méthode de Schayer, décrite en détail par Kahlson *et coll.*¹⁵ Les comptages du pipsyl histamine ^{14}C ont été effectués dans un compteur à courant gazeux (Tracerlab SC 71), en couche épaisse ou en utilisant une courbe d'autoabsorption établie expérimentalement.

RESULTATS

(a) *Animaux normaux*

Les figures 1, 2, 3 et 4 montrent les images autoradiographiques des reins de rats sacrifiés respectivement 2, 5, 15 et 30 min après l'injection d'histamine ^{14}C . La désignation des différentes zones a été faite suivant la nomenclature préconisée notamment par Sternberg *et coll.*¹⁹

Deux minutes après l'injection, on peut constater que la zone corticale interne (c.i.) constitue une région d'intense radioactivité sous forme de bande continue dont la limite externe, en dents de scie, est caractéristique et la limite interne correspond exactement au début de la zone médullaire externe, colorée en rouge brique sur la coupe de tissu. Par contre cette dernière région (m.e.) ainsi que la corticale externe (c.e.) n'ont produit qu'un faible noircissement du film. Enfin, la médulla interne (m.i.) possède une radioactivité croissant assez régulièrement en intensité jusqu'à la pointe de la papille.

Cinq minutes après l'injection, la répartition n'est pas foncièrement différente : on note toujours la forte activité de la zone corticale interne et la très faible activité de la médulla interne mais, d'une part, le noircissement de la papille s'est fortement accentué et, d'autre part, celui de la corticale externe est légèrement plus affirmé (Fig. 2).

Quinze minutes après l'injection, la principale différence avec les images précédentes réside dans la corticale externe dont le noircissement a continué de s'accentuer sous forme de taches discontinues, de forme ponctuelle ou en bâtonnets. Leur intensité atteint et, pour certaines expériences, dépasse même légèrement celle de la bande continue de la zone sous-jacente (c.i.).

Trente minutes après l'injection on observe une accentuation des modifications observées précédemment : la radioactivité discontinue de la corticale externe est fortement accrue et dépasse nettement en intensité celle de la bande continue de la zone corticale interne, entre les dents de scie de laquelle elle s'insère.

Compte tenu de la rapide dégradation enzymatique de l'histamine, il s'avérait nécessaire de déterminer, dans la radioactivité concentrée dans les deux zones corticales, la fraction attribuable à l'histamine ^{14}C elle-même. A cette fin, les reins prélevés à différents temps après l'injection de 125 μg de bichlorhydrate d'histamine ^{14}C ont été congelés et, après élimination de la zone médullaire, la radioactivité a été extraite dans une solution d'acide trichloracétique à 5 p. 100. Le dosage, sur l'extrait acide ainsi obtenu, du ^{14}C total et de l'histamine ^{14}C permet de déterminer le pourcentage de ^{14}C total attribuable à la seule histamine ^{14}C .

La courbe de la Fig. 5 représente la variation de cette fraction en fonction du temps (chaque point représente la moyenne de 4 expériences). Cette courbe illustre la rapidité de la dégradation enzymatique de l'histamine ^{14}C puisque, 5 minutes après l'injection, plus de la moitié de la radioactivité localisée dans la corticale correspond à des produits de sonm étabolisme.

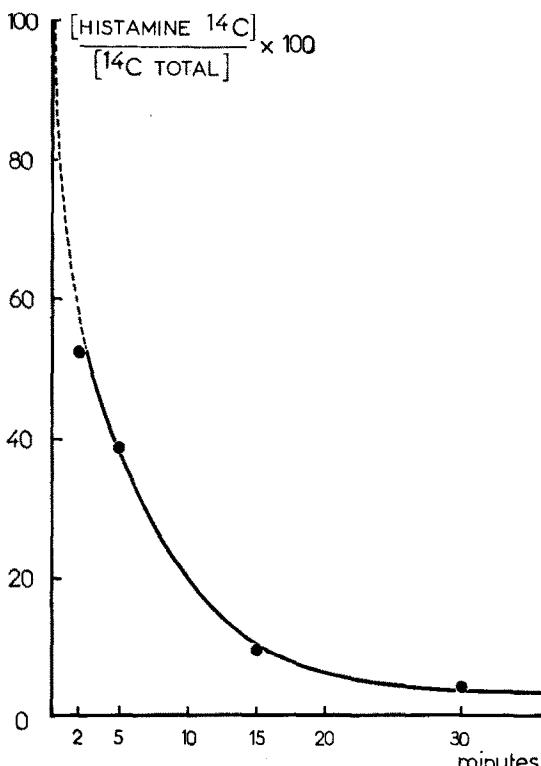
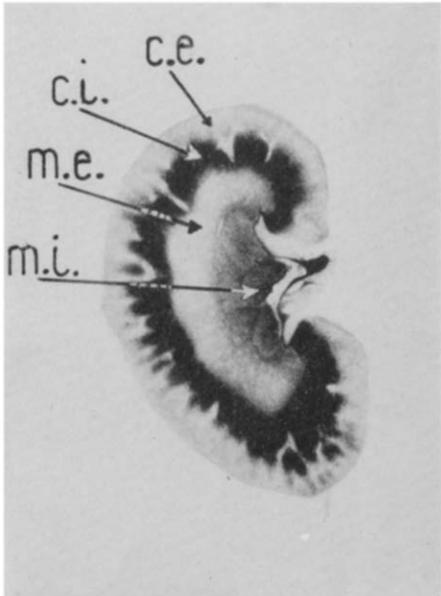


FIG. 5. Variation, en fonction du temps, de la fraction du ^{14}C total localisé dans le cortex rénal attribuable à la seule histamine ^{14}C . Chaque point représente la moyenne de quatre expériences.

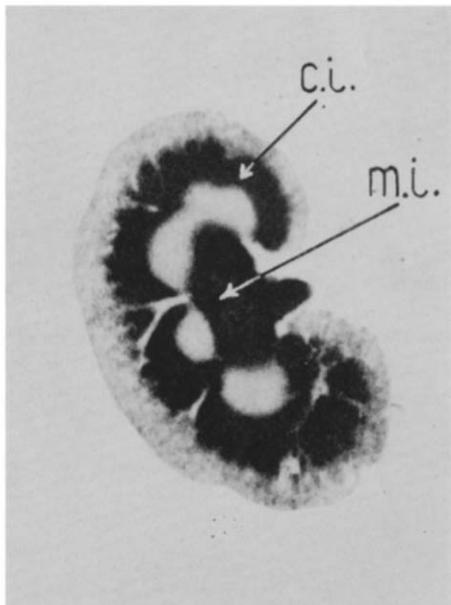
(b) Animaux en diurèse interrompue

La comparaison de l'autoradiogramme correspondant au rein à diurèse arrêtée (Fig. 6) à celui du rein à diurèse libre servant de témoin (Fig. 7), permet de constater que l'arrêt de la filtration glomérulaire dans le premier n'a pas empêché la concentration de l'isotope au niveau de la corticale interne.

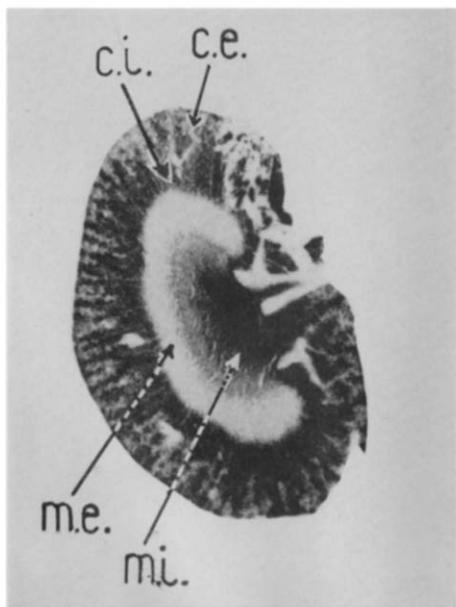
Par ailleurs, sur l'autoradiogramme de la Fig. 6, on note une très faible radioactivité dans la médulla tandis que cette même région, dans la Fig. 7, est caractérisée par un noircissement presqu'uniforme qui englobe la médulla externe. Ce dernier caractère différencie l'autoradiogramme obtenu au cours d'une diurèse osmotique (rein témoin) de celui de l'animal normal sacrifié au même temps (Fig. 2) qui présente un noircissement intense au niveau de la médulla interne, mais presque nul au niveau de la médulla externe.



◀ FIG. 1. Autoradiogramme de rein de rat sacrifié 2 min après l'injection d'histamine ^{14}C . La radioactivité est localisée dans les zones sombres.
c.e. = zone corticale externe; c.i. = zone corticale interne; m.e. = zone médullaire externe; m.i. = zone médullaire interne.



◀ FIG. 2. Autoradiogramme de rein de rat sacrifié 5 min après l'injection d'histamine ^{14}C .
(Abbreviations comme Fig. 1.)

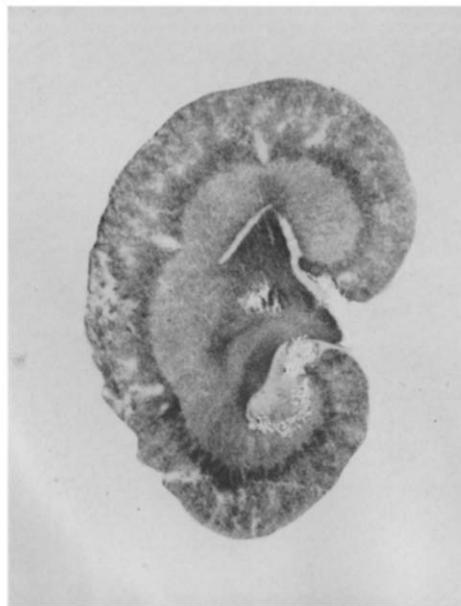


◀ FIG. 3. Autoradiogramme de rein de rat sacrifié 15 min après l'injection d'histamine ^{14}C
(Abbreviations comme Fig. 1.)



FIG. 6. Autoradiogramme de rein de rat soumis ► à une perfusion dans la jugulaire d'une solution de mannitol à 20%: rein gauche, à *diurèse interrompue* par clampage de l'uretère, préalablement à l'injection d'histamine ^{14}C . L'animal a été sacrifié 5 min après l'administration du produit marqué.

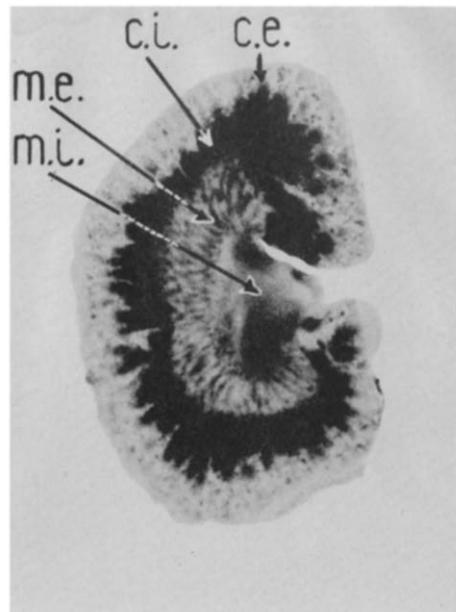
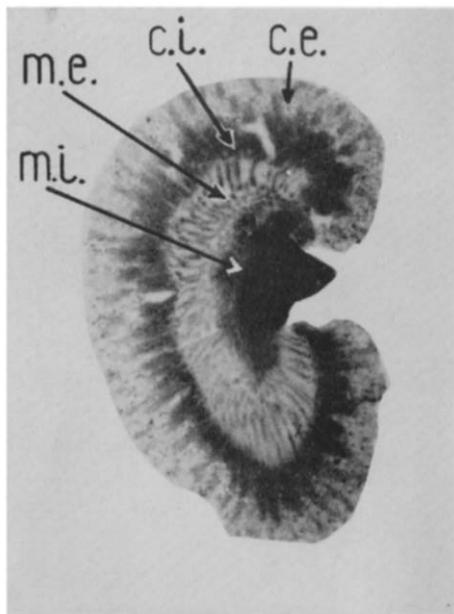
◀ FIG. 4. Autoradiogramme de rein de rat sacrifié 30 min après l'injection d'histamine ^{14}C .



◀ FIG. 7. Autoradiogramme de rein de rat soumis à une perfusion d'une solution de mannitol à 20%: rein droit, à *diurèse libre* (rein témoin).

FIG. 8. Autoradiogramme de rein de rat prétraité par l'aminoguanidine et sacrifié 5 min après l'injection d'histamine ^{14}C .

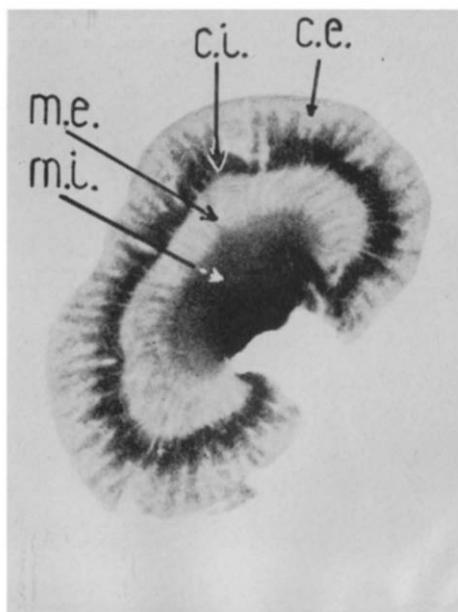
(Abreviations comme Fig. 1.)



◀ FIG. 9. Autoradiogramme de rein de rat prétraité par l'aminoguanidine et sacrifié 15 min après l'injection d'histamine ^{14}C .
(Abreviations comme Fig. 1.)

FIG. 10. Autoradiogramme de rein de rat prétraité par l'aminoguanidine et sacrifié 30 min après l'injection d'histamine ^{14}C .

(Abreviations comme Fig. 1.)



(c) *Animaux prétraités par l'aminoguanidine*

La comparaison des autoradiogrammes de rein des rats prétraités par l'inhibiteur de la diaminoxydase et sacrifiés 5 min (Fig. 8), 15 min (Fig. 9) et 30 min (Fig. 10) après l'injection d'histamine ^{14}C à ceux des animaux normaux sacrifiés aux mêmes temps (Figs. 2, 3 et 4) permet de constater certaines différences. Alors que le noircissement de la zone corticale interne n'est pas modifié, on peut noter que l'inhibition enzymatique entraîne un ralentissement net dans l'envahissement de la zone corticale externe par la radioactivité. En effet le noircissement de cette dernière zone n'atteint jamais en intensité, même à 30 min, (Fig. 10) celui de la zone corticale interne, tandis qu'elle la dépasse nettement au même temps, chez l'animal normal (Fig. 4).

Par ailleurs, chez l'animal prétraité, on constate aux différents temps un noircissement discontinu dans la zone médullaire externe, sous forme de batonnets radiaux.

DISCUSSION

La captation de l'histamine circulante par le rein est un phénomène rapide.² Les présentes expériences indiquent que cette captation s'exerce au niveau de la corticale interne, zone qui possède sélectivement la plus grande part de la radioactivité rénale, deux minutes après l'injection d'histamine ^{14}C .

Cette zone, très caractéristique chez le Rat, possède une structure sans contrepartie chez la plupart des mammifères.¹⁶⁻²⁴ En effet elle ne comporte aucun glomérule et elle est presque exclusivement constituée, en raison de la flexuosité de ces dernières,²⁵ par les portions terminales des tubules proximaux à bordure en brosse bien délimitée, alors que les segments larges ascendants et les canaux collecteurs ne font que la traverser.

Il semble donc que la structure rénale responsable de la captation de l'histamine soit cette portion terminale du tubule proximal. Une localisation dans les cellules du tubule distal semble peu probable, car elle se traduirait sur l'autoradiogramme par un noircissement discontinu de cette région, mais elle ne peut, cependant, être totalement exclue.

Une telle interprétation trouve une confirmation dans la comparaison avec les autoradiogrammes de reins de rats ayant reçu des organomercuriels marqués par ^{203}Hg : on observe une répartition de l'isotope dans la corticale interne, pratiquement superposable à celle que nous obtenons deux ou cinq minutes après injection d'histamine ^{14}C et l'examen histologique a confirmé la localisation du mercure dans les cellules du tubule proximal.²⁶⁻²⁸ De plus, c'est dans cette même zone que se concentre le rouge de phénol dans le rein de Rat.^{20, 29} Or l'excrétion de ce produit par le tubule proximal a été démontrée par différentes méthodes dont celle de diurèse interrompue.

Que ce noircissement de la zone corticale interne corresponde bien à une concentration de la molécule marquée à l'intérieur de la cellule tubulaire est encore montré par le fait que le simple passage dans les vaisseaux ou dans les lumières tubulaires d'une substance, telle l'inuline ^{14}C , incapable de pénétrer dans les cellules, conduit à l'obtention d'autoradiorénogrammes qui ne montrent nullement cette localisation élective.³⁰

Les autoradiogrammes obtenus à partir des reins dans lesquels la filtration glomérulaire a été bloquée préalablement à l'injection d'histamine ^{14}C permettent de préciser quelle est la voie d'entrée de la molécule marquée dans les cellules du tubule proximal.

En effet la persistance d'une zone de forte radioactivité dans la corticale interne, alors que l'arrêt de la filtration glomérulaire est attesté sur les mêmes images par l'absence de radioactivité dans la papille, permet de conclure que la captation n'a pu s'effectuer qu'à partir du sang des capillaires péri tubulaires et, qu'ainsi, l'histamine est en voie d'excrétion, et non de réabsorption, par le tubule proximal.

C'est à cette même portion du néphron qu'on attribue, à la suite d'expériences de diurèse interrompue pratiquées chez le Chien, l'excrétion tubulaire de diverses autres bases organiques: tétraéthylammonium,³¹ choline,³² mécamylamine et mépipер- phénidol.³³ Nos résultats permettent donc de rapprocher le mode et le lieu d'excrétion rénale de l'histamine de ceux de ces bases, ce qui est en accord avec les hypothèses de Lindahl *et coll.*^{8, 9}

Par ailleurs, en ce qui concerne la zone corticale externe, son noircissement tardif et progressif nous semble devoir être mis en relation avec la présence dans cette région de métabolites acides de l'histamine. En effet ce noircissement n'est observé qu'après un temps de séjour prononcé de la molécule marquée dans l'organisme; de plus il semble s'accroître à mesure que la proportion d'histamine dans la radioactivité totale du cortex diminue; enfin il est suspendu de façon significative quand l'oxydation enzymatique de l'histamine est inhibée au moyen de l'aminoguanidine, alors que la captation par la corticale interne ne semble pas qualitativement modifiée dans ces mêmes conditions.

Quant à la présence d'une proportion élevée de métabolites dans le cortex, deux minutes après l'injection d'histamine ¹⁴C, alors que le noircissement intéresse presque exclusivement la zone corticale interne, on peut l'expliquer de deux manières: ou bien la cellule du tubule proximal concentre la seule histamine mais lui fait également subir une dégradation enzymatique avant transfert dans l'urine; ou bien le mécanisme de captation est peu spécifique et la cellule tubulaire est capable de concentrer non seulement l'histamine mais également ses métabolites. Si le présent travail ne permet pas de conclure sur ce point, par contre des expériences effectuées *in vitro*, au moyen de coupes de rein en survie^{34, 35} peuvent être interprétées comme une confirmation de la première de ces deux hypothèses.

RÉSUMÉ

L'étude autoradiographique de la captation de l'histamine par le rein de Rat nous a permis de montrer que cette captation s'exerce dans la zone corticale interne et qu'elle correspond au premier temps d'un processus d'excrétion "active". Les métabolites acides de l'histamine semblent être traités de manière différente par le rein.

BIBLIOGRAPHIE

1. B. ROSE et J. S. L. BROWNE, *Am. J. Physiol.*, **124**, 412 (1938).
2. T. NEVEU, *J. Physiol. Paris*, **52**, suppl. II (1960).
3. G. VALETTE, Y. COHEN et H. HUIDOBRO, *J. Physiol., Paris*, **46**, 545 (1957).
4. G. VALETTE, Y. COHEN et H. HUIDOBRO, *J. Physiol., Paris*, **47**, 292 (1955).
5. N. EMMELIN, *Acta Physiol. Scand.*, **22**, 379 (1951).
6. S. E. LINDELL et H. WESTLING, *Acta Physiol. Scand.*, **37**, 307 (1956).
7. S. E. LINDELL et R. W. SCHAYER, *Br. J. Pharmac.*, **13**, 131 (1958).
8. K. M. LINDAHL et L. SPERBER, *Acta Physiol. Scand.*, **36**, 13 (1956).
9. K. M. LINDAHL et L. SPERBER, *Acta Physiol. Scand.*, **42**, 166 (1958).
10. L. PETERS, *Pharmac. Rev.*, **12**, 1 (1960).

11. S. E. LINDELL et R. W. SCHAYER, *Br. J. Pharmac.*, **13**, 44 (1958).
12. S. ULLBERG, *Acta Radiol. Stockh.*, suppl. 118, (1954).
13. Y. COHEN et H. DELASSUE, *C.r. Soc. Biol. (Paris)*, **153**, 300 (1959).
14. H. E. WILLIAMSON, T. N. SKULAN et F. E. SHIDEMAN, *J. Pharmac.*, **131**, 49 (1961).
15. G. KAHLSON, E. ROSENGREN, H. WESTLING et T. WHITE, *J. Physiol. Lond.*, **144**, 337 (1958).
16. J. B. LONGLEY et E. R. FISHER, *Anat. Rec.*, **120**, 1 (1954).
17. R. C. BAHN et J. B. LONGLEY, *J. Pharmac.*, **118**, 365 (1956).
18. J. BARCLAY et R. F. CRAMPTON, *20th Int. Physiol. Congr. Abstracts of Communic.*, **59** (1956).
19. H. STERNBERG, E. FARBER, L. E. DUNLAP, *J. Histochem. Cytochem.*, **4**, 266, (1956).
20. H. ROLLHÄUSER, *Z. Zellforsch.*, **46**, 52 (1957).
21. J. B. LONGLEY, *J. Histochem. Cytochem.*, **7**, 304 (1959).
22. J. N. BICKERS, E. H. BREMER et R. WEINBERGER, *J. Pharmac.*, **128**, 283, (1960).
23. J. B. CAULFIELD et B. TRUMP, *Am. J. Pathol.*, **40**, 199 (1962).
24. G. RUCART et C. PAYEUR-VILLENEUVE, *Ann. Histochem.*, **7**, 63 (1962).
25. I. SPERBER, *Zoologiska Bidrag Uppsala*, **29**, 249 (1944).
26. A. BERGSTRAND, L. FRIBERG et L. MËNDEL, *Acta Microbiol. Scand.*, **51**, suppl. 144, 115 (1961).
27. R. TAUGNER et J. IRAVANI, *Naunyn Schmiedberg Arch. Exp. Pathol.*, **244**, 539, (1963).
28. R. P. WEDEEN et M. A. GOLDSTEIN, *Science*, **141**, 438 (1963).
29. J. B. LONGLEY, B. BURG et H. J. BURTNER, *Fedn. Proc. Fedn Am. Soccs exp. Biol.*, **19**, 369 (1960).
30. P. F. MERCER et R. S. WASSERMAN, *Science*, **143**, 695 (1964).
31. B. R. RENNICK et G. K. MOE, *Am. J. Physiol.*, **198**, 1 267 (1960).
32. A. J. VANDER, *Am. J. Physiol.*, **202**, 319 (1962).
33. L. A. PILKINGTON et M. J. KEYL, *Am. J. Physiol.*, **205**, 471 (1963).
34. J. C. SCHWARTZ, *Ann. Pharm. Fr.* **23**, 459 (1965).
35. J. C. SCHWARTZ, *J. Physiol. (Paris)*—A paraître.