

Moore and Stein¹³. The pyruvic acid was estimated by the method of Friedman and Haugen¹⁴.

Results and discussion. The AAT and AIAT enzymes were found to increase in all tissues of the aestivating mussel. The increase in amino-transferases is in consonance with the elevation in free amino acids content (table). Since the aminotransferases are known to convert strategic compounds, like α -ketoglutarate, pyruvate, oxaloacetate, glutamate, alanine and aspartate, and function as link enzymes between carbohydrate and protein metabolisms by acting as sources for ketoacids and for gluconeogenesis¹⁰, the same could be envisaged of the role of aminotransferases during aestivation of mussel.

During aestivation due to lack of feeding, the animal depends on its glycogen reserves. Previous reports showed depletion of glycogen in the aestivating gastropods^{2,3} and the same trend was observed in the aestivating fresh water mussel¹⁵. Hence it is likely that, in order to meet the energy demands, the aestivating mussel depends on other sources for its survival. Since the free amino acid content increases in tissues of the aestivating animal; this serves as a precursors for aminotransferases, by converting strategic compounds¹⁰ to meet the energy demands during the torpid stage. Since the activities of aminotransferases are known to alter under physiological conditions¹⁶, the increase in aminotransferases activity in all tissues is justifiable.

On aestivation the elevation of AAT is more heterogeneous with foot showing maximal activity (67.74%) while the elevation of AIAT in all tissues is more or less homogeneous, i.e. the activity level in all the tissues ranges from 23 to 39% (table).

The AAT/AIAT ratios were found to alter in the tissues of aestivating mussel. The AAT/AIAT ratios of foot was 1.0 while mantle and the digestive gland were 0.9 and 0.95 respectively. This shows that the mantle and digestive gland are more prone towards AIAT while the foot is relatively

more prone towards AAT. In general the AAT/AIAT ratios suggests a shift in enzyme activity pattern, showing preponderance towards AIAT enzyme activity which is in agreement with the increase in pyruvic acid content in all tissues of the aestivating mussel (table). Hence it can be reasonably inferred that the over-all increase in aminotransferases, particularly AIAT enzyme, may contribute effectively for gluconeogenesis to meet the energy demands during the period of suspended animation.

- 1 Acknowledgment. The authors thank Professor K. S. Swami, Head, Department of Zoology, for encouragement and Mr I. Kabeer Ahamed for his help.
- 2 V.R. Meenakshi, *J. zool. Soc. India* 9, 62 (1958).
- 3 G.C. Coles, *Comp. Biochem. Physiol.* 25, 517 (1968).
- 4 Katherine, C. Newman and Robert E. Thomas, *Comp. Biochem. Physiol.* 50A, 109 (1975).
- 5 Y. Sreenivasa Reddy and K.S. Swami, *J. exp. Biol.* 14, 191 (1976).
- 6 C. Wernstedt, *Nature* 154 (1944).
- 7 B. Eckstein and M. Abraham, *Physiol. Zool.* 32, 310 (1959).
- 8 S. Ragupathyam Reddy, *Life Sci.* 6, 341 (1967).
- 9 P. Murali Mohan and P. Muralikrishna Dass, *Veliger* 12, 37 (1969).
- 10 W.E. Knox and O. Greengard, in: *Advances in Enzyme Regulation*, vol. 3, p. 247. Ed. G. Weber. Pergamon Press, New York 1965.
- 11 S. Reitman and Frankel, *Am. J. clin. Path.* 28 (1957).
- 12 O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr and R.J. Randall, *J. biol. Chem.* 193, 265 (1951).
- 13 S. Moore and W.H. Stein, *J. biol. Chem.* 211, 907 (1954).
- 14 Friedman and H'Anger in: *Hawk's Physiological Chemistry*, 14th ed., p. 1108. Ed. B.L. Oser. Mc Graw-Hill New Delhi 1965.
- 15 Md. R. Begum and K.V. Ramana Rao, unpublished data.
- 16 F. Rosen, N.R. Roberts, L.E. Budnik and C.A. Nichol, *Science* 127, 287 (1958).

Mise en évidence de l'excrétion urinaire d'antigènes de la membrane basale glomerulaire (MBG) dans l'urine de 3 rongeurs (rat, souris et cobaye)

Evidence of urinary glomerular basement membrane (GBM) antigens excretion in 3 rodents (rat, mouse and guinea-pig)

J. Cambar¹, Y. Piquet², J. Montoriol³ et Y. Mesnier²

Laboratoire de Pharmacodynamie, Faculté de Pharmacie, 91, rue Leyteire, F-33000 Bordeaux (France), 26 septembre 1977

Summary. Immunodiffusion technique, with rabbits antibodies against rat glomerular basement membrane (GBM), permits to evidence the presence of GBM antigens into normal urines of 3 rodents (rat, mouse and guinea-pig). These results confirm the earlier works in human and rabbit urines and show the antigenic communality existing between the 3 rodents GBM, since we can evidence antigens of 3 different mammals with the same antibody. The origin and the nature of this patterns and the signification of this presence into mammalian urines are discussed.

Des produits antigéniques solubles issus de la membrane basale glomérulaire (MBG) ont été mis en évidence dans l'urine de certains mammifères, notamment chez l'homme⁴⁻⁶, chez le lapin⁷⁻⁹ et très récemment chez le rat¹⁰. La présence éventuelle de tels produits est recherchée dans l'urine concentrée de souris et de cobaye par la méthode d'immunodiffusion¹¹ à l'aide d'anticorps de lapin anti-MBG de rat.

Matériel et méthodes. Préparation des MBG. La pulpe corticale de 200 reins de rat est broyée au moyen d'une spatule sur des tamis aux pores de 74 μm de côté. Les glomérules traversant ce premier tamis sont recueillis sur un second aux pores plus petits (53 μm de côté). La suspension de glomérules obtenue est abondamment lavée, puis traitée au sonicateur pendant 15 min. Des lavages

successifs la débarrassent de tout élément cellulaire et permettent ainsi l'obtention d'une suspension de MBG pure qui est lyophilisée. Le contrôle de pureté de cette suspension est effectué en microscopie électronique. Préparation des anticorps anti-MBG chez le lapin, 0,4 ml de la MBG brute est émulsionnée à volume égal par de l'adjuvant de Freund complet et injectée le 1^{er} jour à chaque lapin dans le coussinet plantaire. La même dose est administrée par voie intramusculaire après 3 semaines, tous les 8 jours pendant 6 semaines. Lorsque la présence d'anticorps spécifiques contre la MBG, solubilisée par 2 stérilisations à l'autoclave pendant 2 h¹² est nettement décelable dans le sérum des animaux par immunodiffusion, les animaux sont saignés et les sérum collectés sont réunis pour former un pool sérique d'anticorps anti-MBG.

Mise en évidence des antigènes d'origine MBG dans l'urine des rongeurs. Les urines de 10 animaux (rats, cobayes ou souris), placés individuellement dans des cages à métabolisme, sont récoltées toutes les 12 h pendant 3 jours puis réunies, purifiées par préfiltration (pores 5 et 0,22 µm), conservées à 4°C en présence d'azide de sodium. Elles sont ensuite concentrées par ultrafiltration Millipore (membranes PSAC), ramenées à un volume terminal de 1 ml et enfin dialysées contre du sérum physiologique.

6 puits périphériques entourant un puits central sont aménagés avec un emporte-pièce dans la gélose de boîtes de Pétri. Chaque puits contient 20 µl. Les échantillons d'urines concentrées (dilués de 1:1 à 1:36) sont déposés dans les puits périphériques et l'immunsérum total de lapin (contenant les anticorps anti-MBG de rat) dans le puits central. 2-4 jours après les dépôts, les arcs de précipitation sont recherchés à la loupe, sous un éclairage latéral.

Résultats. Mise en évidence des antigènes avant absorption de l'immunsérum. Le puits central renferme de l'immunsérum de lapin anti-MBG de rat natif. Avec les urines concentrées de rat, nous obtenons 2 lignes de précipitation; l'une, proche du puits central, est présente pour toutes les dilutions, l'autre n'apparaît qu'avec les dilutions 1:1 et 1:2. Avec les urines concentrées de cobaye et de souris, on observe un seul arc de précipitation présent respectivement jusqu'aux dilutions 1:8 et 1:16.

Mise en évidence des antigènes après absorption de l'immunsérum. L'immunsérum natif est absorbé à volume égal avec 0,5 ml de sérum de rat et laissé incuber pendant 3 h à 37°C, puis une nuit à 4°C. On remarque que dans les mêmes conditions que précédemment, il apparaît une seule ligne de précipitation avec les urines des 3 animaux. La disparition de la ligne la plus intense chez le rat signe la présence d'antiprotéines sériques de rat dans l'immunsérum de lapin, qui s'explique par le fait que la suspension de MBG purifiée renferme des traces de protéines sériques de rat. L'absorption de l'immunsérum de lapin par du sérum de lapin, de cobaye et de souris donne les mêmes résultats. Par la méthode de précipitation en double diffusion, les 3 urines ont donné des réactions d'identité partielle, laissant à penser que certains antigènes sont communs à ces 3 espèces. A partir de ce même immunsérum de rat, nous avons même pu révéler des produits originaires de la MBG dans les urines humaines.

Discussion. La préparation d'un immunsérum de lapin spécifique anti-MBG de rat, à partir d'une suspension de MBG purifiée, permet de révéler la présence de produits antigéniques issus de la MBG dans les urines de 3 rongeurs. La mise en évidence de ceux-ci chez la souris, le cobaye et

le rat s'ajoute à celle effectuée par nos prédecesseurs chez l'homme et le lapin et suggère la grande généralité de cette excréption urinaire chez les mammifères. De plus, il est intéressant de noter que l'immunsérum anti-MBG de rat a permis de révéler non seulement la présence de MBG dans l'urine de rat mais aussi dans celle du cobaye et de la souris. Cela tend à prouver qu'il existe une communauté antigénique entre la MBG de ces 3 rongeurs.

La mise en évidence d'un tel complexe antigène-anticorps précipitant (entre les anticorps anti MBG de rat et les antigènes présents dans l'urine des rongeurs) signe-t-elle la présence indubitable de produits originaires de la membrane basale glomérulaire? Si la réponse est affirmative, toute considération d'ordre quantitatif doit être néanmoins prudente et nuancée. En effet, Mahieu¹² a montré une analogie biochimique et immunologique entre les membranes basales glomérulaires et tubulaires. Certains auteurs^{9,13,14} craignent même que l'on puisse déceler en même temps des substances issues de membranes basales appartenant à d'autres organes (poumons notamment).

Quelle peut être la nature de ces produits antigéniques originaires de la MBG décelés dans l'urine des mammifères? D'après Mac Phaul et Dixon⁴ les produits excrétés dans l'urine humaine seraient riches en sucres et de poids moléculaire élevé. Lerner⁵ a isolé, toujours chez l'homme, 2 antigènes urinaires: l'un riche en sucre, l'autre plus léger. Leurs coefficients de sédimentation respectifs sont 7,58 et 2,58. Tous les 2 migrent en électrophorèse dans la zone des pré-albumines. Récemment, Batsford⁹ a mis en évidence dans l'urine de lapin la présence de produits antigéniques de haut poids moléculaire, compris entre 100 000 et 300 000. Comment de tels produits, de poids moléculaire si différents, peuvent-ils se retrouver dans les urines des mammifères? On peut concevoir qu'ils pourraient provenir, soit d'une fragmentation des protéines constitutives de la MBG, *in situ*, par des enzymes protéolytiques¹⁵, expliquant ainsi l'important turn-over de la MBG décrit par Chow¹⁶ et Walker¹⁷, soit d'une excréption directe de produits de biosynthèse ou de catabolisme par les cellules épithéliales et mésangiales, qui participent intensément à l'élaboration du matériel glycoprotéique^{18,19}.

Devant la complexité et la variété des produits séparés en gel de polyacrylamide²⁰ après solubilisation de la MBG native isolée (particulièrement insoluble) par diverses méthodes plus ou moins efficaces, l'étude de la nature et de l'origine d'antigènes solubles originaires de la MBG et excrétés dans les urines physiologiques des mammifères nous semble une approche nouvelle et riche de promesses du métabolisme de la membrane basale glomérulaire.

- 1 Nous remercions sincèrement le Docteur Mahieu (Laboratoire de Clinique et Sémiologie Médicales, Institut de Médecine de l'Hôpital Universitaire de Bavière à Liège, Belgique) de l'aide précieuse qu'il a bien voulu nous accorder.
- 2 Service d'Immunochimie, Centre de Transfusion Sanguine de Bordeaux.
- 3 Service de Clinique Néphrologique, Hôpital Pellegrin, F-33000 Bordeaux.
- 4 J.J. Mac Phaul, Jr. et F.J. Dixon, dans: Proteins in normal and pathological urine, p. 63-66. Karger, Basel 1970; J.J. Mac Phaul, Jr. et F.J. Dixon, *J. exp. Med.* 130, 1395 (1969).
- 5 R.A. Lerner, J.J. Mac Phaul, Jr. et F.J. Dixon, dans: Proteins in normal and pathological urine, p. 63-66. Karger, Basel 1970.
- 6 H. Marquardt, C.B. Wilson et F.J. Dixon, *Kidney Int.* 3, 57 (1973).
- 7 D. Hawkins et G.G. Cochrane, *Immunology* 14, 665 (1968).
- 8 W.H. Boesken, K. Meinhardt, I. Rentsch et D.K. Hammer, *Int. Archs Allergy appl. Immun.* 43, 232 (1972).
- 9 S.R. Batsford et J. Hardwicke, *Clin. Nephrol.* 3, 60 (1975).
- 10 J. Cambar, Y. Piquet, F. Mesnier et J. Canellas, *C. r. Soc. Biol.* 171, 355 (1977).
- 11 J. Ouchterlony, *Acta Path. Microbiol. scand.* 25, 186 (1948).
- 12 P. Mahieu, Thèse d'Agrégation de Médecine, Université de Liège 1974.
- 13 B. Antoine et T. Neven, *J. Lab. Clin. Med.* 71, 101 (1968).
- 14 E.L. Greene, S.P. Halbert et J.C. Pallavicini, *Int. Archs Allergy appl. Immun.* 40, 861 (1971).
- 15 A. Janoff et J.D. Zeligs, *Science* 161, 702 (1968).
- 16 A.Y.K. Chow et K.N. Drummond, *Lab. Invest.* 20, 213 (1969).
- 17 F. Walker, *J. Path.* 107, 119 (1972).
- 18 W. Romen, B. Schultze et K. Hempel, *Virchows Arch. B Cell Path.* 20, 125 (1976).
- 19 P. Mahieu, J. Foidart et C. Dechenne, Colloque International sur la Biologie et la Pathologie des Membranes Basales, Paris, octobre 1977.
- 20 T. Sato et R.G. Spiro, *J. biol. Chem.* 251, 4062 (1976).