

## ATTEINTE TUBULAIRE RENALE APRÈS INTOXICATION EXPERIMENTALE PAR LE CHROME

A. MUTTI<sup>1</sup>, A. CAVATORTA<sup>1</sup>, A. COSI<sup>1</sup>, S. LUCERTINI<sup>1</sup>,  
G. OLIVETTI<sup>3</sup> et I. FRANCHINI<sup>2</sup>

*Institut de Séméiologie Médicale<sup>1</sup>, Chaire de Médecine du Travail<sup>2</sup> et Institut d' Anatomie  
Pathologique<sup>3</sup> Université de Parme, Parme, Italie*

### RÉSUMÉ

Les altérations fonctionnelles des tubes rénaux et les lésions morphologiques qu'on a relevées après intoxication aiguë documentent une action directe du chrome sur le tube contourné proximal. Certains indices d'atteinte rénale se sont montrés augmentés dès les premières phases de l'intoxication. Une sensibilité particulière a été enregistrée pour la beta-glucuronidase urinaire, qui est résultée significativement augmentée en relation avec une vacuolisation apicale plus importante.

Le traitement chronique n'a pas produit l'insuffisance rénale. Malgré l'accumulation du chrome dans la corticale rénale, les altérations fonctionnelles rénales se sont montrées occasionnelles. Chez les rats, comme chez l'homme, la néphrotoxicité du chrome est due plus à l'absorption aiguë qu'à l'accumulation chronique du métal. La réversibilité des lésions après la suspension de l'exposition peut être expliquée par le renouvellement cellulaire qui suit l'atteinte tubulaire, d'une façon similaire à celui qui a lieu après la nécrose tubulaire aiguë.

L'hypothèse selon laquelle le rein représente un organe critique pour l'action toxique du chrome est justifiée par de nombreuses observations cliniques et expérimentales. Le rein est la voie principale de l'excrétion du métal: chez des travailleurs exposés, l'excrétion urinaire du chrome augmente sensiblement dès l'arrêt du travail<sup>7</sup>; en plus, elle est étroitement liée à la concentration ambiante de chrome hydrosoluble<sup>18</sup>.

Bien que l'excrétion soit rapide, le chrome peut s'accumuler dans l'organisme, en particulier dans le rein, au cours d'une exposition prolongée. L'accumulation rénale semble être liée à la réabsorption tubulaire du chrome filtré par les glomérules<sup>6</sup>: la fraction excrétée du chrome filtré est assez modeste, environ 1%<sup>7</sup>. La diminution progressive de la réabsorption du chrome filtré, observée chez les travailleurs exposés, pourrait être liée à l'accumulation du métal dans le parenchyme rénal<sup>4</sup>.

L'insuffisance rénale aiguë après intoxication accidentelle<sup>5</sup> et après intoxication par voie expérimentale<sup>9</sup> a été attribuée à l'action toxique directe du

chrome. Elle se manifeste par une nécrose tubulaire aiguë et la persistance de la membrane basale des tubes. Les lésions sont limitées aux tubes contournés proximaux<sup>2</sup>. Elles sont vraisemblablement produites par les concentrations élevées du métal dans cette zone du néphron, par suite des phénomènes de réabsorption préalablement mentionnés.

Nous avons voulu évaluer l'action néphrotoxique du métal dans différentes conditions expérimentales, c'est à dire après intoxications aiguë et après des temps variables de traitement chronique. Nous avons aussi étudié le rapport entre les tableaux morphologiques et les altérations fonctionnelles, au moyen de l'examen des reins au microscope électronique et de la détermination de certains indices d'atteinte tubulaire, utilisables dans le monitoring biologique des travailleurs exposés.

#### MATERIELS ET METHODES

Nous avons utilisé 60 rats Wistar de sexe féminin: poids entre 140 et 220 g (poids moyen 170 g). Les rats vivaient dans des conditions hygiéniques et diététiques standard avec eau à volonté.

Un groupe de 20 animaux a été intoxiqué au moyen d'une seule administration sous-cutanée de 15 mg/kg de bichromate de potassium ( $K_2Cr_2O_7$ , Carlo Erba) en solution aqueuse à 6%. Le deuxième groupe de rats a reçu 3 mg/kg, un jour sur deux, pendant une période de 2 à 12 semaines. Le troisième groupe de 15 rats, utilisé comme groupe de contrôle, a été traité avec une solution saline (NaCl 0,9%).

Chaque expérience a été faite sur deux rats. Les expériences ont été effectuées à différentes périodes après l'intoxication aiguë (toutes les 4 heures de la première à la 48ème heure) et à des intervalles d'une semaine pendant le traitement chronique (de la deuxième à la 12ème semaine); les déterminations pendant le traitement chronique ont toujours été effectuées deux jours après la dernière administration.

On a anesthésié les animaux par injection intrapéritonéale de pentobarbital de sodium (Nembutal 6 mg/100 g); on a ensuite trachéotomisé les rats avec insertion d'un cathéter en polyéthylène (PE 240). Un autre cathéter de diamètre inférieur (PE 50) a été inséré dans l'artère fémorale droite pour l'enregistrement de la tension artérielle (Hewlett Packard 770 2 B). On a ensuite introduit un cathéter (PE 50) dans la veine jugulaire gauche, relié à une pompe (Braun Melsungen mod. 240) pour l'injection régulière d'inuline à 2% (0,4 ml/min). Après la stabilisation de la concentration plasmatique en inuline, on a déterminé la filtration glomérulaire. L'urine a été prélevée directement de la vessie par un cathéter (PE 50) pendant 30 minutes; les échantillons de sang ont été prélevés de l'artère fémorale droite au début, au milieu et à la fin de la période de clearance (100  $\mu$ l de sang à chaque prise). Le même échantillon d'urine a été employé pour doser les protéines, la muramidase, la beta-glucuronidase et le glucose.

Le processus de fixation *in vivo* et la préparation pour l'examen morphologique ont été les suivants: après avoir isolé l'aorte abdominale et avoir

ligé les artères iliaques et mésentériques, on a inséré un cathéter (PE 190) relié à une pompe pour l'injection à débit constant (2,0 ml/min). On a procédé ensuite à la perfusion pendant 90 sec. avec tampon phosphaté (pH 7,2) contenant 100 U.I. d'éparine/ml, après avoir clampé l'aorte thoracique et incisé la veine rénale gauche. On a alors infusé de la formaldéhyde glutaraldéhyde<sup>11</sup>. A la fin de la perfusion on a prélevé le rein gauche de chaque animal, on l'a disséqué en le découpant en bandes de la largeur de 1 mm, perpendiculairement à l'axe longitudinal et à travers l'épaisseur de la corticale et de la médullaire. Les échantillons ont été ensuite fixés à température ambiante pendant 3 heures, lavés plusieurs fois avec tampon phosphaté 0,1 M (pH 7,2).

Les échantillons ont été conservés à température de 4 °C pendant 12 heures et post-fixés avec tampon phosphaté contenant 1% de tétraoxyde d'osmium. Puis on a procédé à la déshydratation avec de l'acétone et on les a plongés dans de l'araldite.

Au moyen d'un ultramicrotome (Reichert Om U2) on a obtenu des sections de 0,5 µm comprenant toute l'épaisseur de la corticale et la zone médullaire extérieure. On a traité les sections au bleu de méthylène et à la safranine. On a préparé ensuite des sections de 60 à 70 nm pour l'examen au microscope électronique (Siemens Elmiskop 1A), après traitement par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb.

Sur les échantillons de sang et d'urine, prélevés comme on l'a décrit, on a exécuté les déterminations suivantes: protéinurie par la méthode de Donaggio modifiée par Heremans<sup>10</sup>, muramidase urinaire par la méthode de Prockop et Davidson<sup>15</sup>, beta-glucuronidase urinaire par la méthode de Paul et coll.<sup>14</sup> modifiée par Leonard<sup>12</sup> et inuline plasmatique et urinaire par la méthode de Walser et coll.<sup>19</sup>.

## RESULTATS

La méthode de fixation *in vivo* qu'on a suivi nous a donné des images morphologiques normaux chez les rats témoins.

Les altérations morphologiques après intoxication aiguë sont évidentes au niveau des tubes contournés proximaux: on observe tout d'abord une augmentation de la vacuolisation apicale (Fig. 1); les mitochondries sont intactes et les lysosomes présentent des aspects différents suivant les diverses phases de la digestion.

Ensuite (Fig. 2), on peut observer l'apparition de vacuoles géantes. La figure 3 montre la nécrose cellulaire, 24h après l'administration du toxique: les mitochondries déchargées dans la lumière tubulaire sont encore bien conservées. La figure 4 montre une phase plus avancée de lésion cellulaire: un tube contourné proximal peut être reconnu uniquement par la présence de la membrane basale qui est d'ailleurs intacte.

La figure 5 décrit l'augmentation des indices de lésion tubulaire après l'administration de la dose aiguë. La bêta-glucuronidase, enzyme à poids moléculaire élevé, qui est contenue en concentrations élevées dans la corticale du



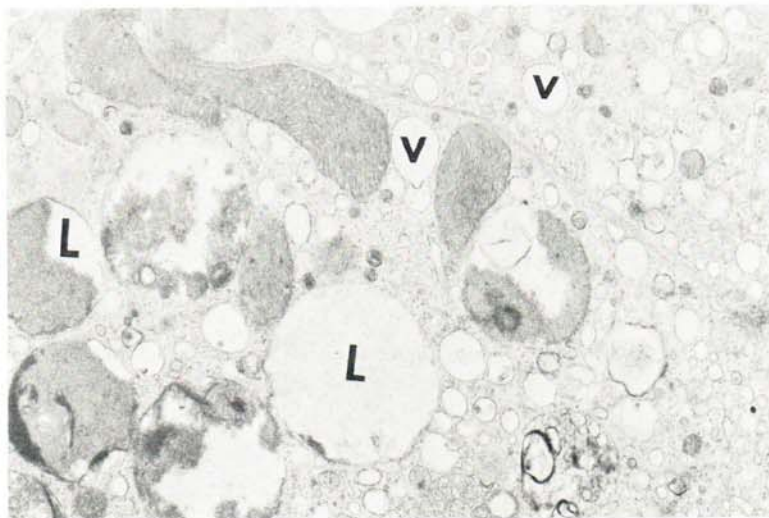


FIG. 1 - Tube contourné proximal d'un rat 4 heures après l'intoxication aiguë par le chrome: on observe l'augmentation du nombre des vacuoles (v) à travers tout le cytoplasme. Les lysosomes (L) présentent des aspects différents suivant les diverses phases de la phagocytose. Acétate d'uranyle et citrate de plomb (x 35 000).

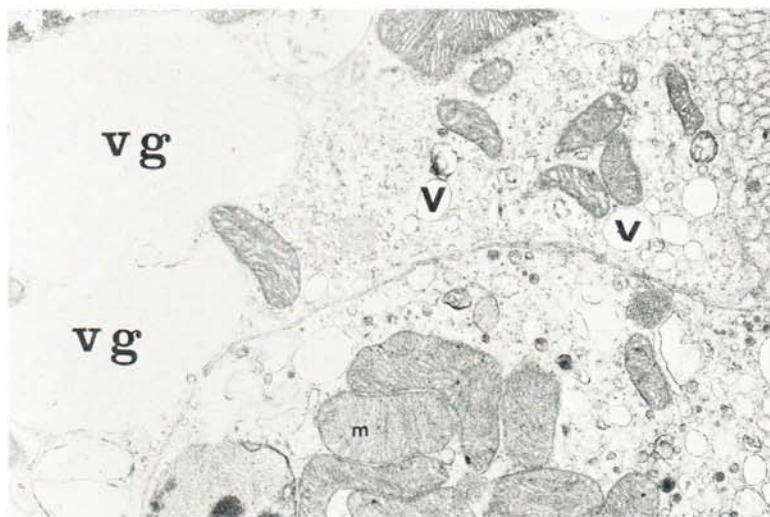


FIG. 2 - 18 heures après l'administration de chrome (15 mg/kg) on observe la formation de vacuoles géantes (VG); les mitochondries sont bien conservées. Acétate d'uranyle et citrate de plomb (x 20 000).

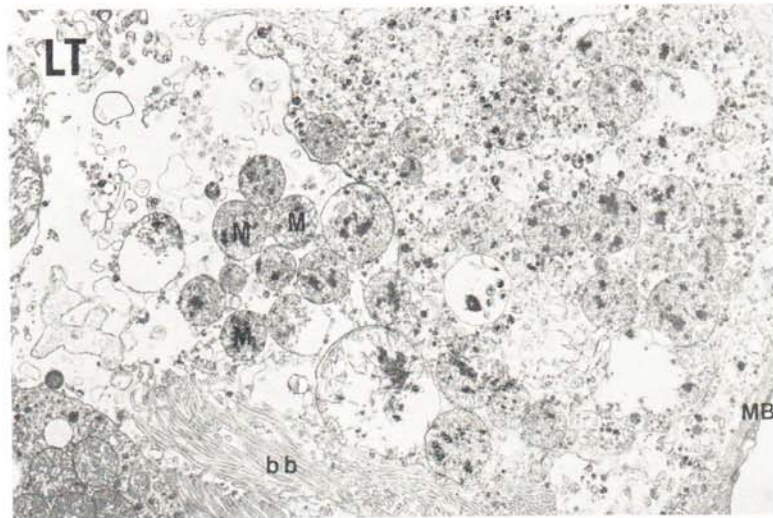


FIG. 3 - 24 heures après l'administration de chrome on observe la nécrose cellulaire. Dans la lumière tubulaire les mitochondries (M) sont conservées. Acétate d'uranyle et citrate de plomb (x 20 000).

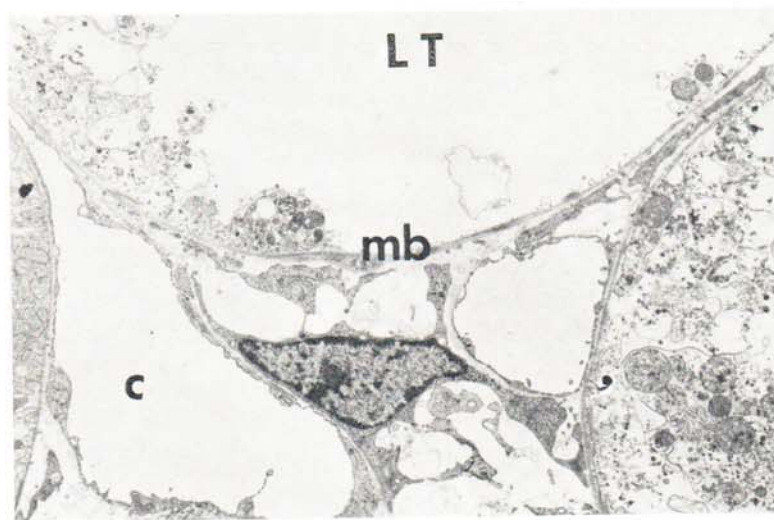


FIG. 4 - Après la nécrose cellulaire la structure d'un tube proximal est reconnue par la membrane basale (mb). Acétate d'uranyle et citrate de plomb (x 6 200).

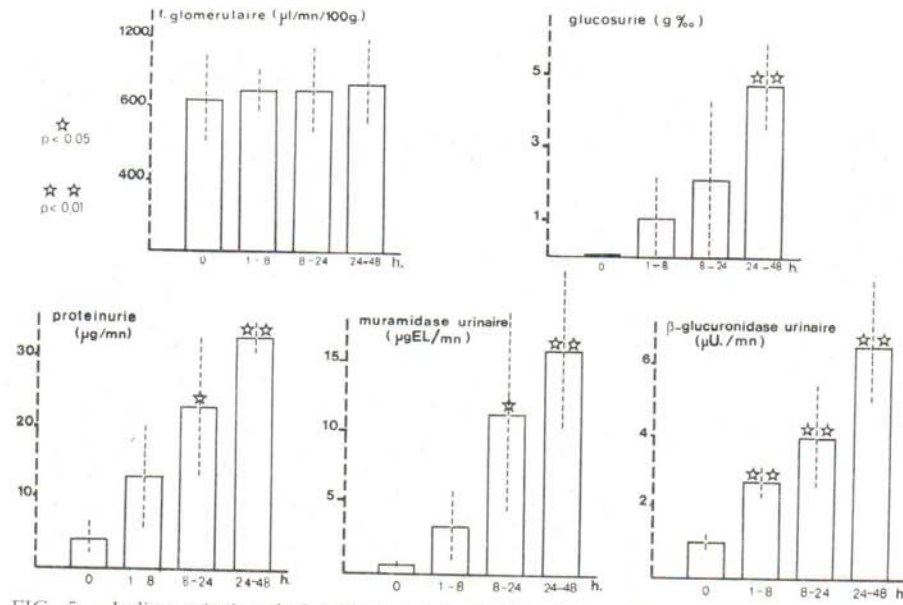


FIG. 5 - Indices urinaires de fonction tubulaire: la bêta-glucuronidase est déjà significativement augmentée dès les premières phases de l'intoxication, uniquement caractérisées par une vacuolisation apicale plus importante.

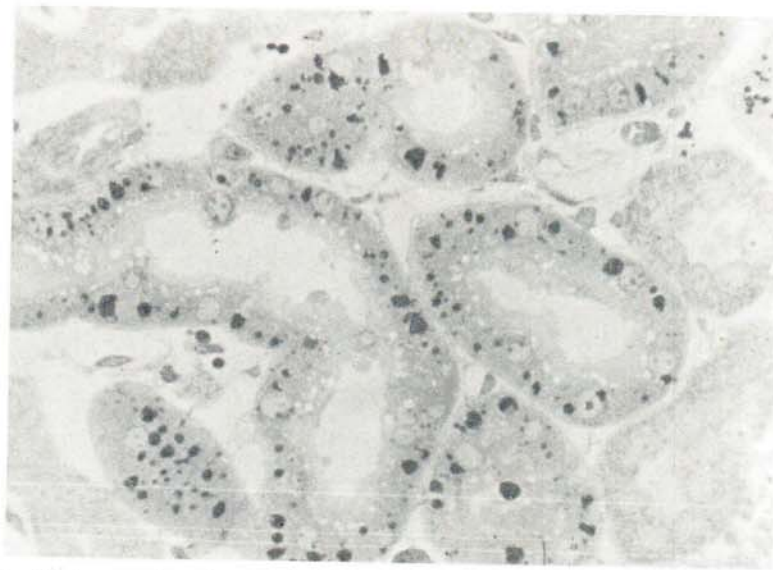


FIG. 6 - Traitement chronique par le chrome (3 mg/kg tous les deux jours; 10ème semaine): l'épithélium des tubes contournés proximaux contient un grand nombre de corps denses. Section sous-capsulaire colorée au bleu de méthylène et à la safranine, x 350.

rein, présente une augmentation significative dès les premières phases d'atteinte cellulaire, uniquement caractérisées par l'augmentation de la vacuolisation apicale. L'accroissement de la protéinurie et de la muramidase urinaire est lié à des altérations morphologiques plus évidentes et plus étendues: en effet on l'a observé huit heures au moins après l'administration du toxique.

Le traitement chronique cause une accumulation du métal dans le parenchyme rénal; celle-ci est démontrée par le décèlement d'amas à densité optique élevée dans l'épithélium des tubes contournés proximaux.

Ces formations sont évidentes dans les néphrons sous-capsulaires (Fig. 6) tandis qu'elles se révèlent modestes en nombre et dimensions dans les néphrons juxtamédullaires (Fig. 7). Au microscope électronique ces amas se sont montrés constitués par du matériel électrodense (Fig. 8); pendant le traitement ils augmentent de volume, en s'approchant de la lumière tubulaire (Fig. 9).

La vacuolisation cellulaire, qui est l'altération la plus significative de l'intoxication aiguë, est beaucoup moins prononcée pendant le traitement chronique (Fig. 10). En plus elle s'est montrée limitée à des groupes isolés de néphrons.

Du point de vue fonctionnel chez 50% des rats on a observé aussi une augmentation des indices urinaires d'atteinte tubulaire et, en particulier, de la beta-glucuronidase.



FIG. 7 - Chez le même rat les tubes contournés proximaux des néphrons juxta-médullaires ne revèlent pas d'altérations évidentes. Bleu de méthylène et safranine, x 350.



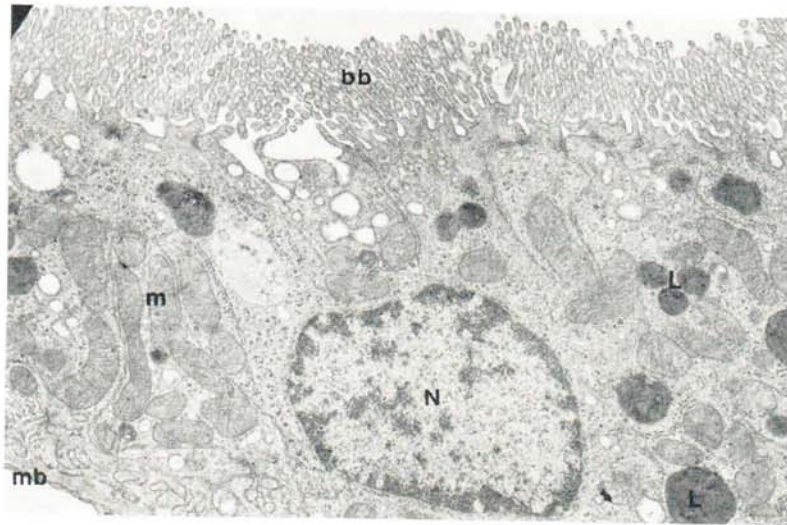


FIG. 8 - Traitement chronique (6ème semaine): dans le cytoplasme des cellules épithéliales du tube contourné proximal, on observe l'augmentation du nombre et des dimension des lysosomes, tandis que les autres structures cytoplasmiques ne sont pas modifiées. Acétate d'uranyle et citrate de plomb ( $\times 11\ 000$ ).

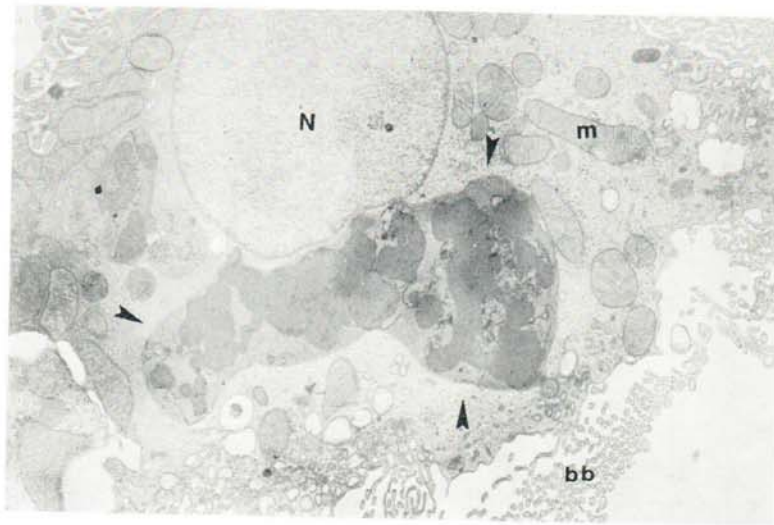


FIG. 9 - Traitement chronique (10ème semaine). Les structures lysosomiales sont groupées en formations plus complexes, qui s'approchent de la lumière tubulaire. Acétate d'uranyle et citrate de plomb ( $\times 12\ 500$ ).



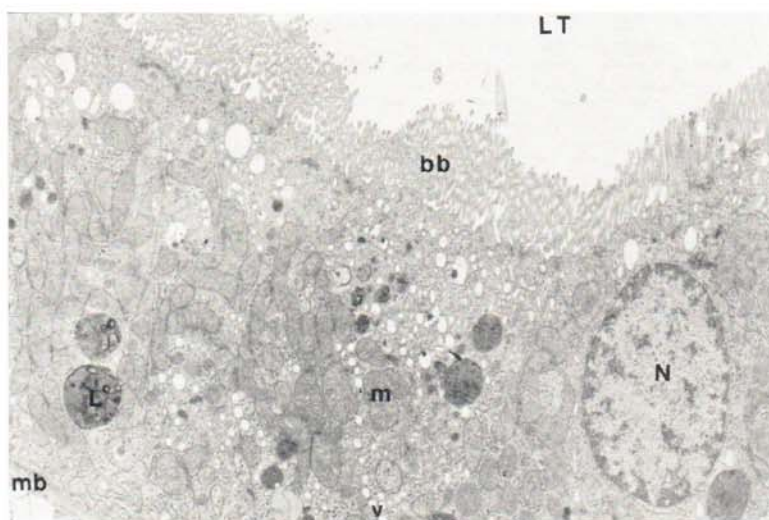


FIG. 10 - Traitement chronique (12<sup>ème</sup> semaine). Dans quelques tubes le cytoplasme contient des vacuoles grossières, surtout, dans toute l'épaisseur cellulaire. Acétate d'uranyle et citrate de plomb (x 6200).

#### DISCUSSION

La néphrotoxicité du chrome est évidente après intoxication aiguë; aux doses administrées, les altérations morphologiques sont limitées au tube contourné proximal des néphrons sous-capsulaires. L'atteinte élective de ces néphrons est due probablement à des facteurs hydrodynamiques qui entraînent dans cette zone une réabsorption plus élevée du toxique.

L'inhibition de la réabsorption tubulaire qui suit l'expansion extra-cellulaire et la redistribution du flux hématique intra-rénal qui suit l'administration de furosemide<sup>3</sup> rendent les rats réfractaires à l'insuffisance rénale aiguë, après intoxication par le chrome hexavalent ou le chlorure de mercure<sup>9,17</sup>. Le fait que les traitements mêmes ne permettent pas d'empêcher l'évolution vers l'insuffisance rénale aiguë, lorsqu'ils sont effectués après l'administration des toxiques<sup>13</sup>, semble exclure une pathogénie ischémique de l'insuffisance rénale. Cela conformément à notre individuation de mitochondries intègres même dans les phases les plus avancées d'atteinte cellulaire. En effet, l'évolution vers l'insuffisance fonctionnelle semble conditionnée par l'accumulation de débris cellulaires et par la formation de cylindres<sup>7</sup>. Parmi les indices d'altération de la fonction tubulaire dans les phases prénécrotiques, nous avons remarqué que la beta-glucuronidase urinaire est déjà significativement augmentée, lorsque le tableau morphologique est caractérisé seulement par une plus importante vacuolisation apicale. Il s'agit donc d'un indice plus sensible que la protéinurie, dont l'augmentation est entraînée par une atteinte rénale plus grave et plus étendue.

Au cours du traitement chronique, malgré la dose très élevée, les indices morphologiques de lésion cellulaire sont apparus beaucoup moins nets, et circonscrits; les altérations les plus évidentes sont représentées par des amas de matériel électrodense, qui tendent à occuper une grande partie du cytoplasme. A l'augmentation en nombre et dimension de ces formations, correspond l'augmentation progressive de la concentration du métal dans le parenchyme rénal.

Les images morphologiques, observées au cours du traitement chronique diffèrent donc qualitativement de celles qu'on a observées après l'intoxication aiguë: dans les premières on remarque la formation d'amas électrodenses, tandis que la vacuolisation est modeste; dans les secondes apparaît une dégénération vacuolaire grossière, sans que les dépôts intracellulaires soient évidents.

Il est nécessaire de souligner que les lésions, soit en cas d'intoxication aiguë soit pendant le traitement chronique, sont limitées à l'épithélium tubulaire<sup>1</sup>. L'intégrité de la membrane basale et l'absence d'évidentes altérations interstitielles nous font supposer comme probable la réversibilité des lésions à travers le renouvellement cellulaire.

Du point de vue pratique, l'expérimentation sur les rats nous a confirmé que le rein est un organe critique au cours de l'intoxication par le chrome. Les lésions rénales surviennent surtout à cause de l'absorption aiguë du toxique, plutôt qu'à l'accumulation du métal. Pourtant, chez l'homme, il est important de ne pas sous-estimer les expositions intenses, même de courte durée.

Les effets néphrotoxiques peuvent être dépistés à un stade précoce par la détermination des indices de fonction tubulaire et, en particulier, par la beta-glucuronidase urinaire.

#### REFERENCES

1. *Baines, A. D.* Cell renewal following dichromate induced renal tubular necrosis. *Am. J. Pathol.*, **47** (1965) 851-876.
2. *Biber, T. U. L., Mylle, M., Baines, A. D., Gottschalk, C. W., Oliver, J. R., MacDowell, M. C.* A study by micropuncture and microdissection of acute renal damage in rats. *Am. J. Med.*, **21** (1968) 664-705.
3. *Birtch, A. G., Zakheim, R. M., Jones, L. G., Barger, A. C.* Redistribution of renal blood flow produced by furosemide and ethacrinic acid. *Circ. Res.*, **21** (1967) 869-878.
4. *Borghetti, A., Mutti, A., Cavatorta, A., Falzoi, M., Cigala, F., Franchini, I.* Indices rénaux d'exposition aiguë et d'imprégnation chronique par le chrome. *Med. Lav.*, **68** (1977) 355-363.
5. *Chiesura, P. et Bonadonna, A.* Su di un caso di insufficienza renale acuta per intossicazione da anidride cromica. *Minerva Nefrol.*, **15** (1968) 152-156.
6. *Collins, R. J., Fromm, P. O., Collings, W. D.* Chromium excretion in the dog. *Am. J. Physiol.*, **201** (1961) 795-798.
7. *Franchini, I., Mutti, A., Gardini, F., Borghetti, A.* Excrétion et clairance rénale du chrome par rapport au degré et à la durée de l'exposition. *Rein et Toxique*, Masson Ed., Paris, 1975, pp. 271-277.
8. *Flamenbaum, W., McDonald, F. D., Di Bona, G. F., Oken, D. E.* Micropuncture study of renal tubular factors in low dose mercury poisoning. *Nephron*, **8** (1971) 221-234.

9. *Henry, L. N., Kashgarian, M.* Micropuncture studies on the pathophysiology of acute renal failure in the rat. *Lab. Invest.*, **19** (1968) 309–314.
10. *Heremans, J. F.* La réaction de Donaggio. Ses fondements biochimiques et ses applications en pathologie. III La réaction de Donaggio dans les urines. *Rev. Belg. Pathol. Med. Exp.*, **26** (1958) 264–311.
11. *Karnosky, M. J.* Formaldehyde-glutaraldehyde fixation of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, **27** (1965) 137–138.
12. *Leonard, C. D.* Urinary beta-glucuronidase in man: relation to urinary specific gravity and creatinine concentration. *Clin. Nephrol.*, **2** (1974) 41–43.
13. *Oken, D. E.* Local mechanism in the pathogenesis of acute renal failure. *Kidney Int.*, **10** (1976) S94–S99.
14. *Paul, W., Schapiro, A., Gonisch, H.* Studies of human kidney and urine beta-glucuronidase: biochemical characteristics. *Enzymol. Biol. Clin.*, **8** (1967) 47–66.
15. *Prockop, D. J., Davidson, W. D.* A study of urinary and serum lysozyme in patients with renal diseases. *New Engl. J. Med.*, **270** (1964) 269–274.
16. *Schaller, K. H., Essing, H. G., Valentin, H. and Schacke, G.* The quantitative determination of chromium in urine by flameless atomic absorption spectroscopy. *Atom. Absorp. Newslett.*, **12** (1973) 147–150.
17. *Thiel, G., Brunner, F., Wunderlich, P., Huguenin, M., Bienko, B., Torborst, J., Peters-Haefeli, L., Kirchertz, E. J., Peters, G.* Protection of rat kidneys against HgCl<sub>2</sub>-induced acute renal failure by induction of high urine flow without renin suppression. *Kidney Int.*, **10** (1976) S 191–S 200.
18. *Tola, S., Kilpiö, J., Virtamo, M. and Haapa, K.* Urinary chromium as an indicator of the exposure of welders to chromium. *Scand. J. Work Environ. Health*, **3**, (1977) 192–202.
19. *Walser, M., Davidson, D. G., Orloff, J.* The renal clearance of alkali stable inulin. *J. Clin. Invest.*, **34** (1955) 1520–1523.