



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

### Rôle des hyaluronidases dans l'ischémie-reperfusion rénale

Bastin, Stéphanie

*Award date:*  
2007

[Link to publication](#)

#### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX**

**NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**Rôle des hyaluronidases dans l'ischémie-reperfusion rénale**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
licencié en Sciences biologiques**

Stéphanie BASTIN  
Septembre 2007

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 Namur  
Téléphone : +32(0)81.72.44.18 – Téléfax : +32(0)81.72.44.20  
E-mail : joelle.jonet@fundp.ac.be – <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

## **Rôle des hyaluronidases dans l'ischémie-reperfusion rénale**

BASTIN Stéphanie

### Résumé

Les hyaluronidases sont responsables du catabolisme de l'acide hyaluronique, un des principaux constituants de la matrice extracellulaire. Ce mémoire a pour but d'étudier l'intervention des hyaluronidases et plus particulièrement d'Hyal-1 dans la phase post-ischémique précoce au niveau du rein et de ses différentes zones. Dans ce mémoire, trois objectifs ont été ciblés : l'identification du profil d'activité hyaluronidasique dont l'enzyme est responsable en zymographie, la mise en évidence de la protéine par la technique de western blot et enfin l'étude de l'évolution de l'expression d'Hyal-1 suite à un épisode d'ischémie-reperfusion. Cette étude a été favorisée par l'utilisation de souris knock-out pour cette enzyme.

Les résultats montrent que l'enzyme Hyal-1 est responsable de la bande d'activité inférieure du doublet observé dans un rein wildtype en zymographie. Cette technique nous permet, en corrélation avec des recherches antérieures obtenues au laboratoire, d'affirmer que cette enzyme voit son taux d'expression diminuer fortement lorsque le rein est prélevé 24heures après un épisode d'ischémie-reperfusion. Le résultat de cette expérience n'a pas pu être confirmé par la technique de western blot qui ne montrait pas de reconnaissance spécifique de la protéine mais cette affirmation a cependant été renforcée par l'étude en RT-PCR quantitative en temps réel de l'évolution du taux d'expression du gène Hyal-1 à différents moments après l'ischémie-reperfusion. En effet, lorsque le rein est prélevé 24heures après avoir subi une ischémie, on observe une diminution jusqu'à 80% du taux d'expression du gène dans toutes les zones du rein. Lorsque le rein est par contre prélevé après 7 jours, c'est-à-dire lorsque il est en train de se régénérer, le taux d'expression du gène réaugmente par rapport au premier jour mais n'atteint cependant pas le taux d'expression du rein d'un animal contrôle, sauf dans le cas du cortex rénal. Cette étude nous a donc permis de mettre en évidence que l'expression d'Hyal-1 était modifiée dans une phase post-ischémique rénale précoce.

Mémoire de licence en Sciences biologiques  
Septembre 2007

**Promoteur : B. Flamion**

**Co-promoteur : A. Legrand**

*En quelques mots, je tiens à remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.*

*Je tiens tout d'abord à remercier Mr. Flamion pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire de Physiologie et Pharmacologie et d'avoir accepté d'être mon promoteur.*

*Je remercie également Mr. Legrand pour son accueil au sein du laboratoire de physiologie de l'UMH ainsi que pour le temps qu'il m'a consacré pour la réalisation des photos nécessaires à ce travail.*

*Mes remerciements vont ensuite à Anne-Emilie Declèves et Sophie Dogné pour leur soutien et leurs conseils avisés tout au long de ce travail ainsi qu'à toutes les personnes qui ont permis l'obtention de ces résultats et notamment ceux de RT-PCR quantitative en temps réel.*

*Je tiens également à remercier tous les gens du laboratoire. Merci à Cécile D., Laurence et Philippe de m'avoir fait une petite place dans leur bureau. Merci également à Cécile O., Bénédicte, Guy, Camille et Martine pour leur aide, leurs nombreux conseils et leur bonne humeur. Merci également à Marie-Christine de m'avoir consacré du temps lors de la réalisation de westerns.*

*Je remercie les membres du jury d'avoir bien voulu prendre le temps de lire ce mémoire.*

*Finalement je voudrais remercier ma famille pour leur soutien et leurs encouragements. Merci à Catherine d'avoir été là dans les moments de fatigue pour me remonter le moral et me changer les idées. Et en dernier lieu, merci à toi, Steve, d'avoir toujours été là pour me soutenir et d'avoir été si patient pendant mes coups de déprime. Ta présence à mes côtés m'a été plus qu'essentielle pour terminer ce mémoire...*

*Stéphanie*

## LISTE DES ABREVIATIONS

A	Ampère
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique Messenger
ATP	Adénosine Triphosphate
BSA	Bovine Serum Albumine
°C	Degré Celsius
CD44	Cluster of Differentiation 44
Ct	Threshold Cycle
CTL	Contrôle
Da	Dalton
dCt	delta Threshold Cycle
ddCt	delta delta Threshold Cycle
dNTP	Désoxyribonucléotide
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
EGF	Endothelial Growth Factor
GAG	Glycosaminoglycan
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosine Triphosphate
H	Heure
HA	Acide Hyaluronique, Hyaluronane
HABP	Hyaluronan-Binding Protein
HARE	Hyaluronan Receptor for Endocytosis
Has	Hyaluronan Synthase
Hprt	Hypoxanthine PhosphoRibosylTransférase
HRP	Horse Radish Peroxydase
Hyal	Hyaluronidase
Hz	Hétérozygote
ICAM-1	Molécule d'Adhésion Intracellulaire-1
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
IL-1	Interleukine-1
I/R	Ischémie/Reperfusion
IR 24h	Rein ischémié et prélevé 24h après la reperfusion
IR 7jr	Rein ischémié et prélevé 7jours après la reperfusion
IRA	Insuffisance Rénale Aiguë
IRC	Insuffisance Rénale Chronique
ISOM	Inner Stripe of Outer Medulla (couche interne de la médullaire externe)
Jr	Jour
KO	Knock-Out
LYVE-1	Lymphatic-Vessel Endothelial hyaluronan receptor-1
M	Molaire
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
ME	Médullaire Externe
HPRT	Hypoxanthine Phosphoribosyltransférase
MI	Médullaire Interne
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
OSOM	Outer Stripe of Outer Medulla (couche externe de la médullaire externe)

Pb	Paire de Bases
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PM	Poids Moléculaire
PMN	Polymorphonucléaire Neutrophile
PVDF	Poly Vinylidene Difluoride
RHAMM	Receptor for Hyaluronan Mediated Motility
Rpm	Rotations Par Minute
RQ	Relative quantification
RTase	Rétrotranscriptase
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SPAM1	Sperm Adhesion Molecule1
TAE	Tris Acetate EDTA
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
Tm	Melting Temperature
TSG6	Secretory Tumor Necrosis Factor-Inducible Protein
UV	Rayon Ultraviolet
V	Volt
VCAM	Molécule d'Adhésion des Cellules Vasculaires
WT	Wildtype

## TABLE DES MATIERES

<b>1. Introduction</b> .....	3
I. Avant-propos.....	3
Le rein : structure et fonction.....	3
II. L'hyaluronane ou acide hyaluronique (HA).....	4
A. Structure chimique et propriétés physico-chimiques.....	4
B. Localisation de l'HA.....	5
C. Localisation de l'HA au niveau rénal.....	5
D. Les protéines liant l'HA.....	6
E. Les rôles de l'HA.....	7
F. Métabolisme de l'HA.....	7
L'anabolisme de l'HA et les HA-synthases (Has).....	7
Le catabolisme de l'HA et les hyaluronidases (Hyal).....	9
Les hyaluronidases.....	9
Classification des hyaluronidases.....	10
Description des hyaluronidases.....	11
Processus de dégradation de l'HA.....	15
Processus de dégradation non enzymatique de l'HA.....	16
III. L'insuffisance rénale et l'ischémie/reperfusion (I/R).....	17
A. Les lésions induites par l'I/R.....	18
Les dysfonctionnements vasculaires et les implications inflammatoires.....	18
Les dysfonctionnements tubulaires.....	19
Le stress oxydatif.....	20
B. La régénération du tissu rénal.....	20
C. L'insuffisance rénale chronique.....	21
<b>2. Buts et démarche du mémoire</b> .....	22
<b>3. Matériel et méthodes</b> .....	23
I. Le modèle expérimental.....	23
A. Préparation des groupes expérimentaux et des échantillons.....	23
Souris non soumises à l'ischémie-reperfusion.....	23
Souris soumises à l'ischémie-reperfusion.....	23
Préparation des échantillons.....	24
Homogénéisation des tissus.....	24
Homogénéisation de cellules Cos.....	24
Dosage des protéines.....	24
II. Etudes enzymatiques, protéiques, et génétiques.....	25
A. Méthode relative à l'activité enzymatique des hyaluronidases, la zymographie.....	25
Principe.....	25
Protocole.....	25
Préparation des gels et des échantillons.....	25
Migration électrophorétique.....	26
Incubation du gel.....	26
B. Méthodes relatives à la présence de la protéine, le western blot et le « true blot ».....	27
Le western blot.....	27
Principe.....	27
Protocole.....	27

Le « true blot », cas particulier du western blot.....	28
Principe.....	28
Modifications par rapport au western blot.....	29
C. Méthodes relatives à l'ADN.....	29
Le géotypage.....	29
Méthode d'extraction de l'ADN.....	29
La Polymerase Chain Reaction ou PCR.....	29
La migration sur gel d'agarose.....	30
D. Méthodes relatives à l'ARN.....	31
Extraction d'ARN.....	31
Dosage.....	31
Migration sur gel.....	31
La RT-PCR quantitative en temps réel.....	31
Transcription inverse.....	32
PCR quantitative en temps-réel Taqman.....	32
<b>4. Résultats et discussion.....</b>	<b>34</b>
A. Préparation des groupes expérimentaux.....	34
Le géotypage.....	34
Introduction.....	34
Conditions techniques.....	34
Résultats et interprétations.....	34
Les groupes expérimentaux.....	35
B. Méthode relative à l'activité hyaluronidasique : la zymographie.....	36
Introduction.....	36
Résultats et interprétations.....	36
C. Western blot et « true blot ».....	40
D. La RT-PCR quantitative en temps réel.....	40
Introduction.....	40
Interprétations des résultats.....	41
<b>5. Conclusions et perspectives.....</b>	<b>45</b>
Préparation des animaux.....	45
Caractérisation de l'activité enzymatique rénale.....	46
Caractérisation de la protéine Hyal-1.....	46
Caractérisation génique.....	47
Les perspectives.....	47
<b>6. Bibliographie.....</b>	<b>49</b>

# 1. INTRODUCTION

## I. Avant-propos

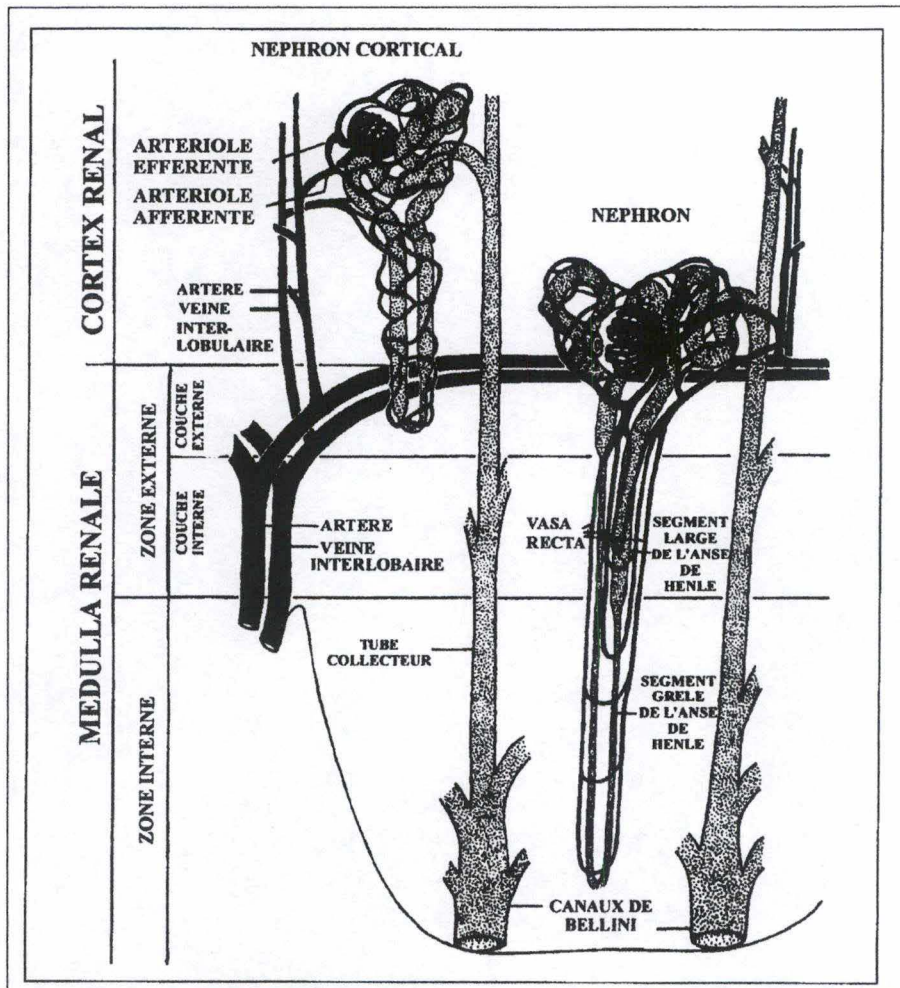
### LE REIN : STRUCTURE ET FONCTION

Le rein est un organe complexe qui peut être divisé en deux zones, le cortex et la médullaire qui se divise elle-même en médullaire externe et médullaire interne. La médullaire externe est constituée de deux zones : l'OSOM (Outer Stripe of Outer Medulla) correspondant à la partie externe et l'ISOM (Inner Stripe of Outer Medulla) correspondant à la partie interne. La médullaire est constituée des pyramides de Malpighi qui se terminent chacune par une papille, du moins dans les espèces multipapillaires comme l'homme. Chaque papille aboutit dans un calice mineur, lui-même suivi d'un calice majeur au niveau du sinus rénal. Plusieurs calices majeurs sont en contact avec l'uretère qui sort du rein par le hile.

Le rein a pour fonction principale la régulation de l'homéostasie hydro-électrolytique de l'environnement extracellulaire. En effet, en élaborant l'urine à partir du plasma sanguin sous un contrôle strict, il assure la stabilité du volume circulant et de la concentration des électrolytes dans les liquides corporels, maintenant ainsi l'équilibre osmotique. De plus, il joue un rôle dans la régulation de l'équilibre acido-basique, dans la métabolisation de certaines substances pharmacologiques ainsi que dans l'élimination de déchets métaboliques tels que l'urée, la créatinine et l'acide urique. Par ailleurs, la synthèse de nombreux facteurs paracrines comme l'angiotensine II et les eicosanoïdes confère au rein la propriété de réguler au mieux ses besoins fonctionnels. Il est en plus doté d'une remarquable capacité d'adaptation morphofonctionnelle, qui peut être sollicitée en cas de réduction de la masse rénale.

Toutes ces propriétés sont assurées grâce aux unités fonctionnelles du rein, les néphrons, ainsi qu'à leur vascularisation particulière (**Figure 1**). Le néphron parcourt tout le rein en passant respectivement par le cortex, la médullaire externe et enfin la médullaire interne. Chaque néphron comprend un corpuscule rénal, siège de l'ultrafiltration du plasma, et un tube urinifère, où l'urine primitive est soumise à des processus d'absorption et de sécrétion afin de former l'urine finale. Enfin, plusieurs néphrons sont connectés à un tube collecteur qui draine l'urine formée vers la papille rénale. Les reins de mammifères sont constitués de trois types de néphrons - les néphrons corticaux, intermédiaires et juxta-médullaires - qui diffèrent selon leur localisation et leur fonction.

L'apport sanguin s'effectue depuis l'artère rénale qui se subdivise successivement en artères interlobaires, arquées, interlobulaires, puis en artéioles afférentes. Ces dernières se ramifient en capillaires artéio-artériels constituant le glomérule et se terminant en artéioles efférentes. L'artéiole efférente se divise alors à son tour en capillaires péritubulaires qui sont ensuite drainés par la circulation veineuse. En outre, les néphrons juxta-médullaires sont entourés d'un réseau vasculaire particulier, les vasa recta, qui présentent une branche descendante et ascendante localisées dans la médullaire et parallèles aux branches de l'anse de Henlé.



**Figure 1 :** Vascularisation des néphrons corticaux et juxta-médullaires.  
(Traduit d'après Pitts, 1976)

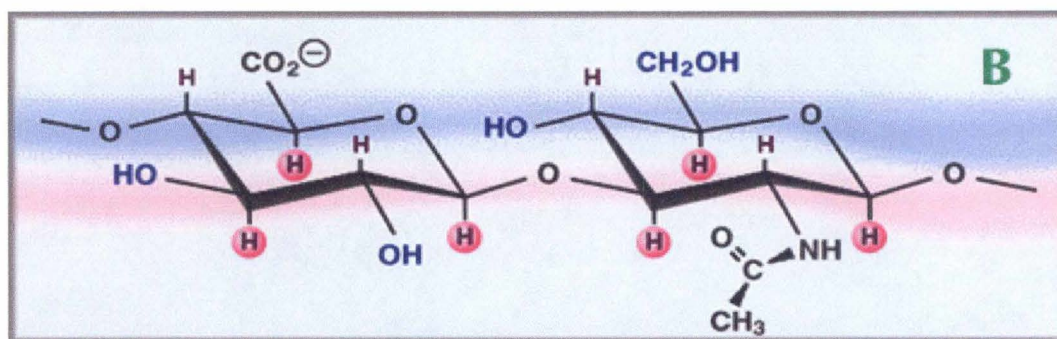
La particularité de la vascularisation rénale réside donc dans la présence d'un premier réseau capillaire glomérulaire de type artério-artériel, et d'un second réseau capillaire péri-tubulaire artério-veineux irriguant tous les néphrons, ainsi que des vasa recta propres aux néphrons juxta-médullaires.

## II. L'hyaluronane ou acide hyaluronique (HA)

### A. STRUCTURE CHIMIQUE ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

L'HA est un glycosaminoglycan (GAG) ubiquiste de haut poids moléculaire (PM), habituellement compris entre  $10^5$  et  $10^7$  Daltons (Da). Celui-ci fut isolé pour la première fois à partir de l'humeur vitrée bovine par Karl Meyer et son assistant John Palmer en 1934. Etant donné sa composition riche en acide uronique, ils lui attribuèrent le nom d'acide hyaluronique (« hyaloïd » = corps vitré). A l'heure actuelle, cette molécule a été renommée hyaluronane suite au fait qu'elle existe *in vivo* sous forme polyanionique et non sous forme d'acide protoné (Hascall et Laurent, 1997).

L'HA est chargé négativement et est constitué d'une répétition d'unités disaccharidiques (acide D-glucuronique  $\beta$  (1-3)-N-acétyl-D-glucosamine- $\beta$  (1-4)) (Meyer et Palmer, 1934) (**Figure 2**). Ce dissaccharide d'un PM d'environ 400 Da et d'une longueur de 1nm peut se répéter jusqu'à 10000 fois au sein d'une molécule d'HA (Laurent et al., 1996). L'HA est le GAG le plus simple, le seul non sulfaté et le seul non lié de manière covalente à une structure protéique (Fraser et al., 1997). De plus, contrairement aux autres GAG synthétisés et assemblés dans le réticulum endoplasmique rugueux et dans l'appareil de Golgi, l'HA est, quant à lui, synthétisé au niveau des membranes plasmiques par une des trois HA-synthases (Has1, 2, 3) qui seront détaillées plus loin.



**Figure 2** : Structure de l'acide hyaluronique : répétitions d'unités disaccharidiques d'acide D-glucuronique et d'N-acétyl-D-glucosamine. (D'après Hascall et Laurent, 1997).

En solution, l'HA se présente sous forme d'un ruban enroulé sur lui-même avec une face hydrophobe et une face hydrophile (Hascall et Laurent, 1997). Celui-ci est stabilisé par des ponts hydrogènes internes (Laurent et Fraser, 1992) ainsi que par les interactions des faces externes avec le solvant (Hascall et Laurent, 1997). Lorsqu'il est concentré à plus de 0,1 mg/ml, les rubans s'enchevêtrent pour former une sphère stabilisée par des interactions de type hydrophobe (Fraser et al., 1997). Les rubans vont interagir entre eux via deux faces hydrophobes ou via de simples agencements stériques. De plus, tout ce réseau contient des pores de différentes dimensions à travers lesquels l'eau, des électrolytes et certains nutriments et protéines peuvent diffuser librement. Toutefois, la vitesse de diffusion des molécules reste toujours faible. (Hascall et Laurent, 1997). Ce principe d'exclusion stérique peut influencer l'activité osmotique et le transport de l'eau dans les matrices extracellulaires (Laurent et Fraser, 1992).

## **B. LOCALISATION DE L'HA**

L'HA est une molécule ubiquiste des tissus conjonctifs et des matrices extracellulaires présente dans la plupart des organes aussi bien chez l'adulte que lors du développement embryonnaire. Son abondance varie considérablement d'un organe à l'autre ainsi qu'au sein des différentes structures d'un même organe (Hansell et al., 2000). Par exemple, l'HA est particulièrement abondant dans le liquide synovial des articulations, le corps vitré, le cordon ombilical ou encore dans le derme et l'épiderme qui en contient plus de 50%. Par contre, il se trouve en quantité moins abondante dans les poumons, les reins et le cerveau.

### **C. LOCALISATION DE L'HA AU NIVEAU RENAL**

Dans le rein, l'HA présente une distribution hétérogène. Il est principalement présent dans la médullaire interne (MI) et la papille, alors qu'il est pratiquement absent du cortex et de la médullaire externe (ME) chez l'individu sain (Hansell et al., 2000). Il existe donc un gradient de concentration cortico-papillaire croissant. La présence d'un tel gradient pourrait s'expliquer par la quasi absence de drainage lymphatique au niveau papillaire, à la différence du cortex (Hansell et al., 2000). Son abondance dans la MI contribuerait à la stabilité mécanique des structures tubulaires et vasculaires de celle-ci (Hansell et al., 2000). De plus, l'HA participerait au mécanisme de concentration de l'urine (Hansell et al., 2000). En effet, lors de la diurèse, la quantité d'HA dans la papille augmente, limitant la réabsorption de l'eau dans le tissu et favorisant donc l'excrétion urinaire. La présence d'HA se traduirait ainsi par un œdème «fonctionnel» séparant les structures impliquées dans la réabsorption d'eau. Au contraire, lors de l'antidiurèse, on observe une diminution de sa concentration papillaire d'HA, facilitant l'absorption d'eau dans l'interstitium médullaire. Dans le cortex, l'HA ne se trouve que dans les tissus conjonctifs périvasculaires et sous-capsulaires (Wells et al., 1990).

En réponse à certaines pathologies ou certaines agressions, la distribution de l'HA peut être modifiée. C'est notamment le cas dans les rejets de greffe (Wells et al., 1993), les néphrites interstitielles (Sibalic et al., 1997) ou encore les lésions d'ischémie-reperfusion (I/R) (Lewington et al., 2000), toutes les situations où l'HA s'accumule dans le cortex. Cette accumulation d'HA est corrélée à une augmentation du contenu cortical en eau, étant donné les propriétés de l'HA à lier les molécules d'eau. Ce phénomène peut même mener à la formation d'un œdème (Göransson et al., 2004).

### **D. LES PROTEINES LIANT L'HA**

L'HA peut se lier à de nombreuses protéines regroupées sous le terme d'hyaladhérines ou «hyaluronan-binding proteins» (HABP). Ces protéines possèdent un domaine de liaison commun constitué d'environ 100 acides aminés, appelé «module de liaison» ou «proteoglycan tandem repeat» (Day et Prestwich, 2002). Bien qu'un «module de liaison» soit suffisant pour lier l'HA, on en compte souvent deux (Camenisch et al., 2000).

Parmi ces HABP, nous trouvons des protéoglycanes (agrécan, versicane, neurocane, hyaluronectine, ...), des récepteurs (CD44, RHAMM, LYVE-1, HARE) et d'autres protéines comme le TSG-6 et la protéine de liaison du cartilage. L'interaction des protéoglycanes (Crespo-Santiago, 2004) et de la protéine de liaison du cartilage (Neame et Barry, 1994) avec l'HA permet le maintien de la structure des matrices.

Certains récepteurs tels que LYVE-1 (lymphatic-vessel endothelial hyaluronan receptor 1), exprimé dans les vaisseaux lymphatiques (Jackson, 2003) et HARE (Hyaluronan Receptor for Endocytosis) (Weigel et al., 2002), exprimé par les cellules endothéliales du foie se lient spécifiquement à l'HA afin de permettre sa dégradation. Le récepteur CD44, considéré comme le principal récepteur de l'HA, joue un rôle non seulement dans sa dégradation mais également dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques au même titre que le récepteur RHAMM (receptor for hyaluronan mediated motility). Ces deux récepteurs sont notamment impliqués dans les voies de signalisation cellulaire influençant la prolifération, la motilité et la survie cellulaire (Toole, 2004).

La protéine TSG-6 (Secretory tumor necrosis factor-inducible protein) est une HABP qui est produite en cas d'inflammation. Selon Lee et ses collaborateurs (1992), la protéine TSG-6 serait impliquée dans les interactions entre cellules et matrice extracellulaire suite à une inflammation ou au cours de la tumorigenèse.

### E. LES ROLES DE L'HA

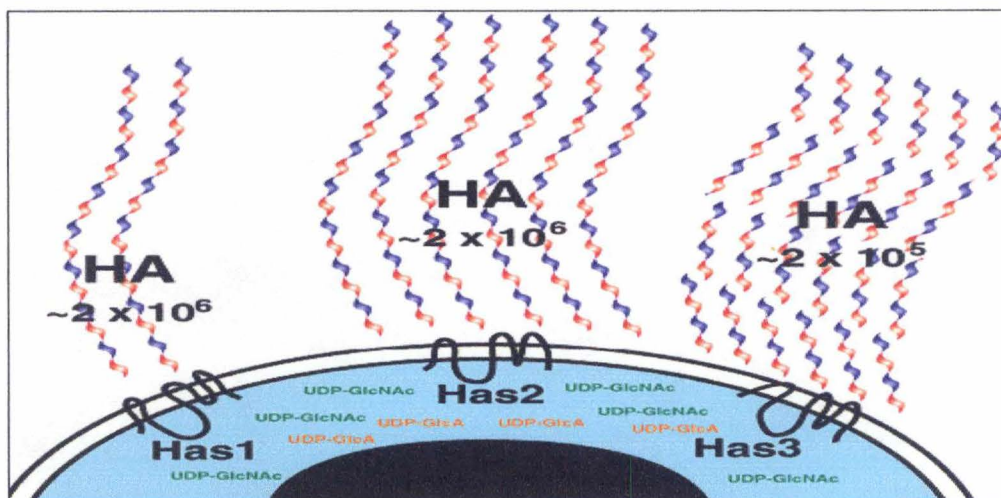
L'HA a longtemps été considéré comme un composant passif des matrices extracellulaires ou des capsules de certaines bactéries. C'est dans les années 80 que l'intérêt pour cette macromolécule a grandi, à la suite de la découverte non seulement de ses récepteurs spécifiques mais également de son implication dynamique dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques (Laurent et al., 1992), tels que la morphogenèse tissulaire, la réparation, la migration cellulaire, l'angiogenèse ainsi que la reconnaissance immunitaire (Termeer et al., 2003). Ces fonctions sont non seulement dépendantes de son PM mais également de ses interactions spécifiques avec diverses molécules. En effet, l'HA de haut PM ( $10^6$  Da) est essentiellement impliqué dans le maintien de la structure extracellulaire et dans la régulation de l'homéostasie (Hansell et al., 1999) ainsi que dans la lubrification et la protection des espaces cartilagineux (Laurent et Fraser, 1992). Les fragments de plus petit PM, quant à eux, sont impliqués notamment dans :

- le **développement embryonnaire**, par interaction avec certains récepteurs de surface dont le CD44. Ces interactions influenceraient les processus de migration et de prolifération cellulaires, ainsi que la dégradation du polysaccharide à des stades critiques du développement embryonnaire (Toole, 1997).
- la **migration cellulaire** lors de l'invasion tumorale (Knudson et al., 1984). En effet, des études ont mis en évidence des interactions entre l'HA et des cellules tumorales au niveau du mélanome où la croissance de celui-ci semble fortement dépendante de sa capacité à fixer l'HA (Toole, 2002).
- l'**angiogenèse** induisant la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Slevin et al., 2002).
- l'**inflammation**, en stimulant la production de chémokines via l'interaction avec le CD44 (Beck-Schimmer et al, 1998) ou encore en induisant la synthèse d'enzymes telles que la NO synthase (Rockey et al., 1998).
- le «**homing**» des lymphocytes T ou la migration de ces cellules dans les tissus soumis à une inflammation (Nandi et al., 2000).

### F. METABOLISME DE L'HA

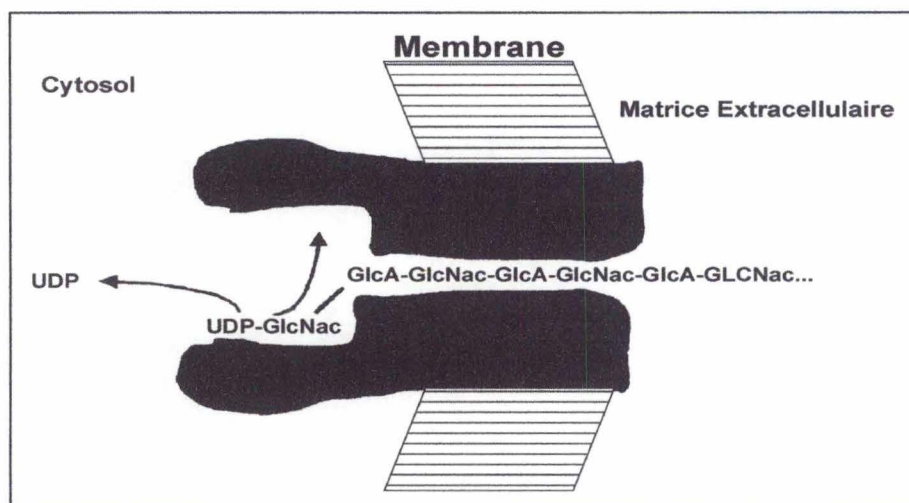
#### **L'anabolisme de l'HA et les HA-synthases (HAS)**

Les HAS sont des protéines difficiles à étudier car une fois solubilisées, elles perdent leur activité. Ce n'est qu'en 1999 que DeAngelis et son équipe ont découvert et caractérisé le premier gène codant pour une HAS dans le streptocoque du groupe A. Quelques années plus tard, on a identifié trois isoformes chez l'homme ainsi que chez la souris, à savoir HAS1, HAS2 et HAS3 issues de trois gènes distincts *has1*, *has2* et *has3* (Lee and Spicer, 2000). Ces protéines présentent une homologie de séquence de 55 à 71% (Spicer et McDonald, 1998) (**Figure 3**).



**Figure 3 :** Schéma des HAS exprimées dans les cellules de mammifères (D'après Spicer et Mc Donald, 1998).

Ces glycosyltransférases sont exclusivement localisées dans la membrane cytoplasmique. Elles coordonnent la polymérisation et la translocation de l'HA hors de la cellule. En effet, sa synthèse s'effectue par l'ajout de précurseurs monosaccharidiques activés au niveau de l'extrémité réductrice de la chaîne en formation (Weigel et al, 1997) tandis que l'extrémité non-réductrice sort dans l'espace péricellulaire via un pore membranaire formé par l'enzyme elle-même (Laurent et Fraser, 1992) (**Figure 4**).



**Figure 4 :** Synthèse de l'HA par une Has à partir de précurseurs monosaccharidiques activés (D'après Lorfèvre, 2004).

Le gène *has1* se trouve sur le chromosome 19 (19q13.3-13.4) (Spicer et Mc Donald, 1998) et code pour la synthèse la moins active. Le gène *has2* est quant à lui localisé sur le chromosome 8 (8q24.12) (Spicer et Mc Donald, 1998) et code pour la HAS2 exprimée au cours du développement embryonnaire ce qui lui conférerait peut-être un rôle dans l'expansion et la croissance tissulaire. Les HAS1 et HAS2 produisent de l'HA de haut PM (2000 kDa) par opposition à HAS3 qui produit des chaînes d'HA de plus faible PM (100-1000 kDa) (**Figure 3**). Le gène *has3* est situé sur le chromosome 16 (16q22.1) (Spicer et Mc Donald, 1998) et code pour l'enzyme la plus active permettant la synthèse de grandes

quantités d'HA de plus faible PM. Cette enzyme est exprimée tardivement dans le développement embryonnaire ainsi que dans de nombreux tissus adultes.

Des études tant *in vitro* (Pasonen-Seppanen et al., 2003) qu'*in vivo* (Bai et al., 2005) ont montré que dans des conditions d'inflammation, les HAS étaient surexprimées. Certains facteurs de croissance comme EGF (Endothelial Growth factor), PDGF (Platelet derived growth factor), TGF $\beta$  (Transforming growth factor  $\beta$ ) et IGF-1 (Insulin-like Growth Factor) ou certaines cytokines comme IL-1 (Interleukin-1), peuvent activer la synthèse d'HA (Heldin, 1989).

Dans le rein, des études *in vitro* ont démontré que les fibroblastes corticaux (Pedagogos et al., 2001) ainsi que les cellules tubulaires proximales (Jones et al., 2003) étaient capables de synthétiser l'HA. Après ischémie, par exemple, les cytokines libérées telles que le TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) ou l'interféron- $\gamma$  peuvent stimuler l'expression et l'activité de HAS1 et HAS2 (Göransson et al., 2004). Ces derniers auteurs ont d'ailleurs étudié l'expression des HAS au niveau de reins de rats sains et ischémisés. Les animaux sains présentaient au niveau du cortex une faible expression de HAS2 et HAS3 ; à l'inverse, cette expression était beaucoup plus élevée dans la MI. En revanche, l'expression HAS1 n'était pas détectable. Après ischémie, une surexpression des ARNm (acide ribonucléique messenger) de l'HAS2 a été mise en évidence dans le cortex alors qu'aucun changement n'était observé dans la MI. De même, l'expression de HAS3 ne semblait pas être affectée (Göransson et al., 2004). Selon les auteurs, cette différence d'expression entre les HAS résiderait dans une différence de sensibilité aux médiateurs inflammatoires ou aux hormones de croissance (Göransson et al., 2004).

Des souris Knock-out (KO) pour ces protéines ont été réalisées. Les souris déficientes pour les gènes *Has1* ou *Has3* sont viables et ne présentent aucun phénotype particulier. Par contre, les souris KO pour *Has2* sont létales et meurent des suites de problèmes cardiaques au cours du développement embryonnaire. Ceci révèle, par conséquent, la nécessité de production de HA via HAS2 lors de l'embryogenèse (Spicer et McDonald, 1998).

### **Le catabolisme de l'HA et les hyaluronidases (Hyal)**

Malgré l'importance biologique de l'HA, son catabolisme n'est pas encore bien compris. L'HA peut être dégradé soit au niveau du tissu d'origine, soit après transport par la circulation lymphatique ou sanguine vers les ganglions lymphatiques ou le foie. Dans ces organes, ce sont les cellules endothéliales délimitant les capillaires sinusoides et les cellules de Kupffer qui internalisent majoritairement l'HA. Le temps de demi-vie de l'HA varie d'un tissu à l'autre, en fonction de l'importance du drainage lymphatique (Laurent et Fraser, 1992). Par exemple, des études ont montré que 10 à 100 mg d'HA étaient renouvelés par jour dans la circulation sanguine (Laurent et Fraser, 1992). En effet, dans le flux sanguin par exemple, le temps de demi-vie de l'HA est rapide (2 à 5min), alors qu'au niveau de l'épiderme, il est de 1 à 2 jours et dans le cartilage, de 1 à 3 semaines.

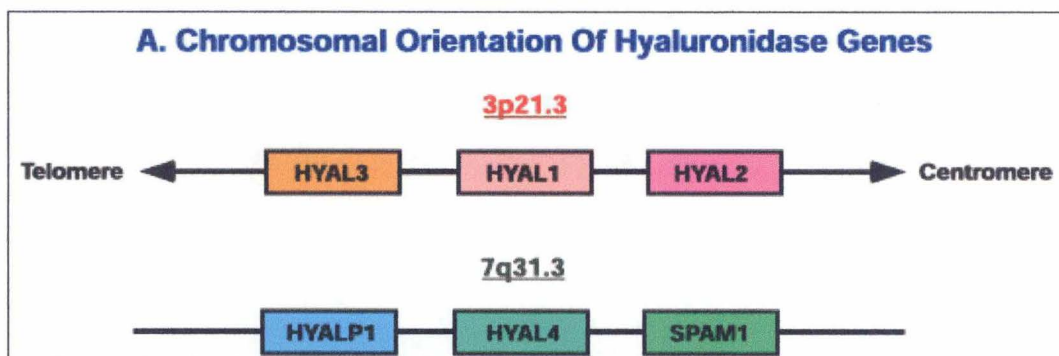
## Les hyaluronidases

L'activité hyaluronidasique fut découverte en 1929 par Duran-Reynals dans des extraits testiculaires. Celui-ci mit en évidence un agent qu'il appela «spreading factor» parce qu'il facilitait la diffusion de différentes substances lorsqu'il était injecté par voie cutanée. Des recherches ultérieures ont démontré qu'il s'agissait d'une enzyme capable de dégrader l'HA (Meyer, 1947). Elle fut nommée PH20.

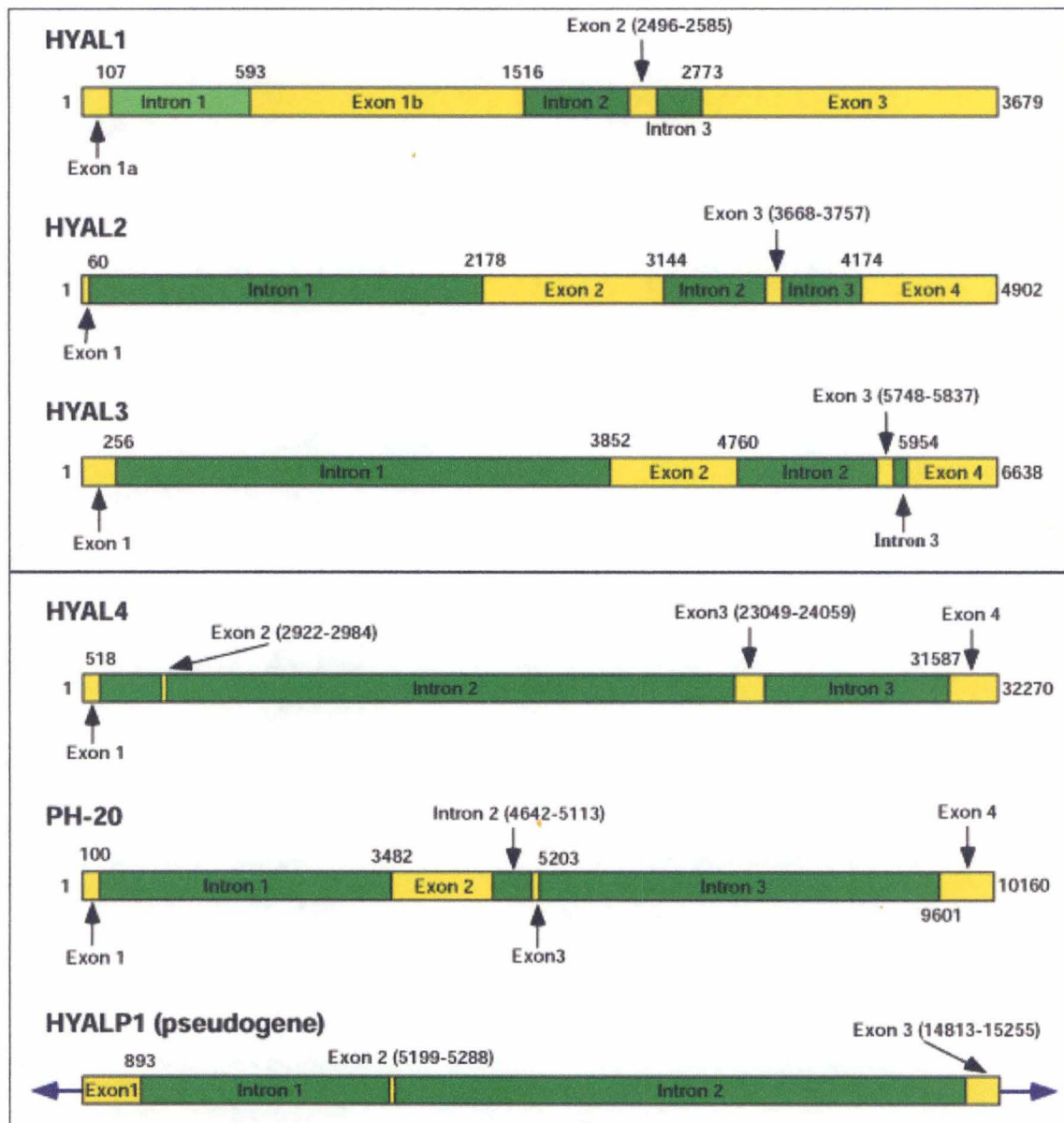
Les hyaluronidases sont difficiles à étudier étant donné leur activité instable et la nécessité d'utiliser des inhibiteurs de protéases et des détergents lors des procédures de purification (Stern et Csoka, 2000). L'isolement de l'hyaluronidase plasmatique humaine, par exemple, n'a pas été facile vu sa très faible abondance (60 ng/ml). Néanmoins, en 1997, Frost et son équipe ont réussi à isoler puis à cloner et à purifier pour la première fois une hyaluronidase, l'hyaluronidase plasmatique, qu'ils ont nommée Hyal-1. Une fois cette enzyme circulante purifiée et grâce aux informations du projet du génome humain et de la banque d'Expressed Sequence Tags, on a pu, par la suite, mettre en évidence l'existence d'une famille de protéines « hyaluronidase-like ».

### Classification des hyaluronidases

Chez les mammifères, il existe 6 séquences «hyaluronidases-like». Les 6 gènes sont activement transcrits et ont une structure génomique similaire (**Figure 5**). L'expression de chacun a une distribution tissulaire unique. Chez l'homme, particulièrement, on trouve 3 gènes situés sur des loci très proches sur le chromosome 3 p21.3 (*Hyal1*, *Hyal2*, *Hyal3*) qui codent pour les hyaluronidases 1, 2 et 3. Trois autres gènes, *Hyal4*, *Hyal-P1* et *Spam1* (Sperm Adhesion Molecule1), se situent sur le chromosome 7q31.3 et sont également très proches. Ils codent respectivement pour Hyal-4, pour un pseudogène (*Hyal-P1*) qui peut être transcrit mais pas traduit chez l'homme, et pour PH20. La structure génomique des gènes des hyaluronidases est illustrée dans la **Figure 6**.



**Figure 5 :** Répartition des 6 hyaluronidases humaines sur les chromosomes 3 et 7 (D'après Stern et Csoka, 2004).



**Figure 6 :** Structure génomique des gènes des hyaluronidases. Les nombres indiquent le début et la fin des exons (D'après Stern et Csoka, 2004).

Les hyaluronidases de mammifères font partie d'une famille de  $\beta$  1-4 endoglucosaminidases qui sont capables de dépolymériser l'HA en tétrasaccharides et en hexasaccharides (Kreil et al., 1995). Ces enzymes sont également capables de dégrader la chondroïtine et la chondroïtine-sulfate. Chez les vertébrés, on peut séparer ces enzymes en deux groupes d'après leur pH d'activité. Dans le groupe des hyaluronidases actives à pH neutre, on trouve les hyaluronidases testiculaires (Primakoff et al., 1985), tandis que les hyaluronidases du sérum (De Salegui et al., 1967) et lysosomales ont un pH d'activité acide (Fischer et al., 1984).

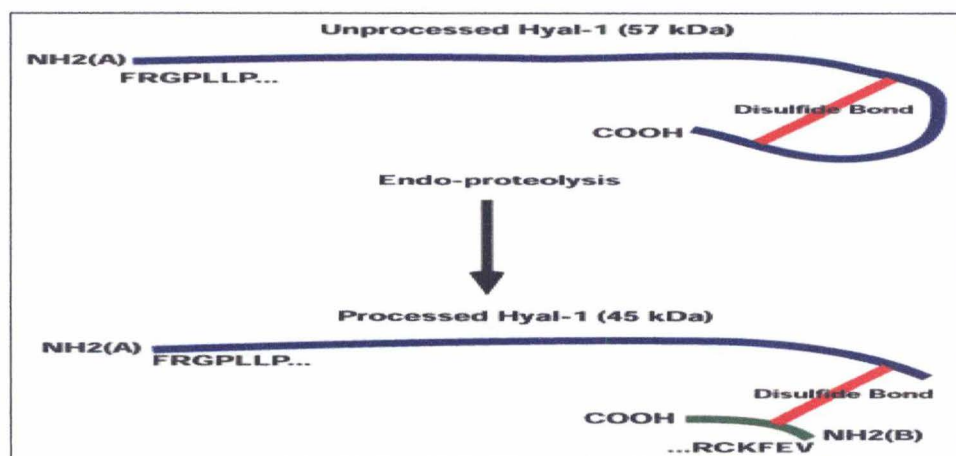
## Description des hyaluronidases

### • HYAL-1

Hyal-1 ou hyaluronoglucosaminidase-1 est la première hyaluronidase isolée à partir du plasma humain qui fut clonée, séquencée et exprimée (Frost et al., 1997). *Hyal-1* est un gène de 2507 kb porté par le chromosome 3p21.3 qui code pour une protéine de 435 acides aminés possédant 40% d'identité avec l'hyaluronidase du spermatozoïde PH-20. Hyal-1 est une protéine ubiquiste mais les taux d'ARNm sont variables selon les organes. Par exemple, les taux les plus élevés se trouvent dans le foie, la rate, le rein et le cœur. Hyal-1 est également présente au sein du poumon, du placenta et du muscle squelettique (Frost et al., 1997) mais semble absente au niveau du cerveau.

De nombreux arguments suggèrent qu'Hyal-1 serait une enzyme lysosomale et qu'elle serait la protéine responsable de l'activité hyaluronidasique qui a été plusieurs fois mise en évidence dans cet organe. Cependant, Stern (2003) a donné différents arguments s'opposant à cette localisation. Par exemple, comment se fait-il qu'une enzyme lysosomale puisse circuler librement dans le sang ? Et pourquoi cette enzyme dont le pH optimum est de 3,8 serait-elle localisée dans un lysosome dont le pH est d'environ 4,5 ?

Hyal-1 est l'enzyme principalement responsable de l'activité hyaluronidasique du plasma. Elle s'y trouve sous la forme d'une protéine de 57kDa composée d'une simple chaîne polypeptidique de 49kDa à laquelle 8kDa supplémentaires sont apportés par des processus de glycosylation. Dans les urines par contre, elle se trouve sous deux formes : l'une de 57kDa, et l'autre, un fragment endoprotéolytique de 45 kDa. (**Figure 7**). C'est d'ailleurs la seule hyaluronidase présente dans l'urine humaine. L'isoforme de 45 kDa résulte de deux étapes endoprotéolytiques supprimant 99 acides aminés à partir de l'extrémité carboxy-terminale générant deux chaînes peptidiques liées par des ponts disulfures (Stern, 2003). L'urine contient une activité hyaluronidasique spécifique cent fois plus élevée que le plasma (Ginetzinsky et al., 1958).



**Figure 7 :** Schéma du processus endoprotéolytique d'Hyal-1 (D'après Stern et Czoka, 2004).

Hyal-1 est capable de cliver les liaisons  $\beta$  1-4 de l'HA ainsi que de la chondroïtine sulfate mais d'une façon plus limitée chez cette dernière.

Lors de l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager d'Hyal-1, il peut arriver que le premier intron soit conservé ce qui engendre alors un ARNm non traduisible (Lokeshwar et al., 2002).

Chez l'homme, en 1996, une déficience en Hyal-1 a été mise en évidence chez un patient. Cette déficience a, par la suite, été renommée mucopolysaccharidose de type IX. Le seul patient décrit à ce jour possède un niveau d'HA circulant 40 à 90 fois supérieurs à la normale. Il présente un retard de croissance et des dépôts d'histiocytes chargés en HA au niveau des articulations (Natowicz et al., 1996 ; Triggs-Raine et al., 1999). La prédominance d'histiocytes pourrait résulter d'une agrégation de macrophages induite par l'HA. Le patient atteint de cette déficience présente deux mutations d'Hyal-1 : tout d'abord une substitution d'acide aminé non conservatrice sur un allèle (G1412A, substituant une lysine par un acide glutamique en position 268 dans un site actif potentiel), ensuite un réarrangement intragénique complexe sur l'autre allèle (la délétion de 37 paires de base (pb) en position 1361 et insertion d'une séquence de 14pb induisant un codon stop prématuré). Une sorte de glissement et de mauvais alignement commençant à l'acide aminé 250 et se terminant 19pb en amont pourrait être à l'origine de ce réarrangement qui, dès lors, induirait l'inactivation de l'enzyme ainsi que l'accumulation d'HA dans les tissus et dans le sang.

Un modèle de souris déficiente en Hyal-1 a été créé et est tout à fait viable. Ces souris KO montrent une prépondérance de la descendance mâle par rapport aux femelles, ce qui suggère que la délétion du gène a un impact plus important que la simple disparition de l'enzyme. Les femelles KO semblent plus petites que les mâles mais celles-ci peuvent avoir un soudain retour de croissance au moment de la maturation leur faisant rattraper ce retard. Un phénotype apparent est également décrit au niveau de leur pelage qui tend à tomber par plaques. De plus, elles présentent une très faible cicatrisation ainsi que des anomalies vasculaires et présentent également des niveaux d'HA circulant supérieurs à la normale.

- **HYAL-2**

En 1998, Lepperdinger et son équipe ont publié leurs travaux sur la découverte d'une autre forme d'hyaluronidase humaine qu'ils ont appelé Hyal-2 (Lepperdinger et al., 1998). L'Hyal-2 murine fut ensuite clonée. Ces deux enzymes possèdent 82% d'homologie.

Hyal-2 est une enzyme qui a un pH d'activité optimal inférieur à 4,0. Le transcrit d'Hyal-2 a été détecté dans le cœur, le placenta, les poumons, le foie, les muscles squelettiques, le rein et le pancréas à différents niveaux d'expression (Lepperdinger et al., 1998). Cette enzyme peut être ancrée à la membrane plasmique par une liaison glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Rai et al., 2001) ou bien se trouver sous forme soluble. Hyal-2 hydrolyse l'HA de haut PM. D'après Lepperdinger (1998), le produit de la réaction est un polysaccharide de 20 kDa correspondant à 50-60 disaccharides. D'après le modèle de Stern et Csoka (2004), décrit plus loin, Hyal-2 agirait de concert avec Hyal-1 afin d'assurer la dégradation de l'HA.

Des études ont également montré qu'Hyal-2 pouvait agir comme un oncogène. En effet, sa surexpression accélère la formation de tumeurs de cellules astrocytaires de souris (Novak et al., 1999).

- **HYAL-3**

L'ARNm d'Hyal-3 a principalement été détecté dans la moelle osseuse et dans les testicules de mammifères (Csoka et al., 1999) mais, actuellement, cette enzyme reste toujours méconnue.

- **PH-20/SPAM, l'hyaluronidase testiculaire**

Cette enzyme fut donc la première hyaluronidase découverte. Elle est localisée au niveau de la membrane plasmique et de la membrane acrosomale interne du spermatozoïde. L'enzyme est formée d'une simple chaîne glycoprotéique liée à une ancre GPI de 64 à 68 kDa. PH-20 a un optimum d'activité à pH neutre (Martin-DeLeon, 2006) et joue plusieurs rôles dans la fertilisation (Cherr et al., 2001). En effet, PH20/SPAM peut lier l'HA via un site distinct du site catalytique, ce qui entraîne une augmentation du calcium intracellulaire facilitant l'attachement du spermatozoïde à la zone pellucide (Cherr et al., 2001).

- **HYAL-4**

Cette enzyme a une distribution limitée au placenta et aux muscles squelettiques. Les études réalisées jusqu'à présent ont mis en évidence une activité chondroïtinasiqque mais pas hyaluronidasique de cette enzyme.

- **HYAL-P1**

Hyal-P1 est un pseudogène chez l'homme car deux délétions, l'une de 28 pb et l'autre de 1 pb, engendrent une terminaison prématurée (Csoka et al., 1999). De petites mutations observées suggèrent que Hyal-P1 aurait dégénéré en pseudogène assez « récemment », suggérant dès lors que ce gène pourrait être un gène actif chez d'autres espèces comme la souris, pouvant coder pour une enzyme hyaluronidasique.

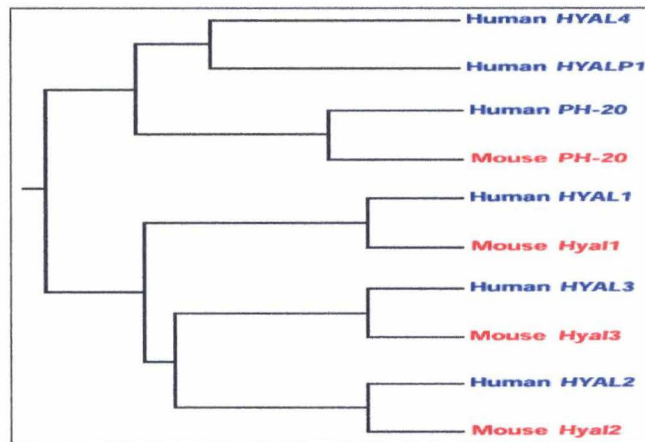
- **HYAL-5**

Cette enzyme fut découverte en 2005 par Kim et son équipe. Cette hyaluronidase a pour rôle de permettre au sperme de souris déficientes en PH-20 de pénétrer la masse du cumulus. Cette protéine a une taille de 55kDa et est abondamment présente dans le sperme de souris. Le gène est exclusivement exprimé dans le testicule et l'enzyme se trouve dans les membranes plasmiques et accrosomales du spermatozoïde. Le gène est situé sur le chromosome 6 de la souris et sa séquence est relativement divergente des autres hyaluronidasiques murines (32 à 36% d'identité). Chez l'homme, on n'a pas encore pu mettre cette enzyme en évidence.

- **Les hyaluronidasiques humaines et murines**

Les gènes orthologues de la souris à l'humain (des gènes orthologues sont des gènes homologues chez deux espèces différentes) ont été trouvés sur les régions du chromosome 9 F1-F2 et 6 A2 (Csoka et al., 1998). Le degré d'homologie entre les paires orthologues chez l'humain et la souris est beaucoup plus grand qu'entre les six paralogues humains (des gènes paralogues sont des gènes qui ont une séquence ancestrale commune directe) (**Figure 8**), ce qui indique que la divergence entre les paralogues doit s'être produite longtemps avant la divergence de ces espèces, soit il y a approximativement 80 millions d'années. Les

pourcentages d'homologie entre la souris et l'homme s'élèvent respectivement à 73% pour Hyal-1, 82% pour Hyal-2 80% pour Hyal-3, 77% pour Hyal-4 et 68% pour Hyal-P1.



**Figure 8 :** Arbre phylogénétique des 6 hyaluronidases humaines et des 4 hyaluronidases de souris (D'après Stern et Czoka, 2004).

### Processus de dégradation de l'HA

Hyal-1 et Hyal-2 constituent les hyaluronidases majeures des tissus somatiques. On pense que ces deux enzymes contribuent respectivement au catabolisme intracellulaire et extracellulaire de l'HA. Le catabolisme de l'HA est principalement enzymatique et se déroule en plusieurs étapes qui restent pour la plupart hypothétiques. Le modèle de Csoka et son équipe, établi en 2004, est considéré comme le plus probable à l'heure actuelle. Selon ces auteurs, l'HA subirait une dépolymérisation progressive réalisée par les deux enzymes, Hyal-1 et Hyal-2. Tout d'abord, le CD44 (cluster of differentiation 44) ou d'autres récepteurs ainsi qu'Hyal-2 ancrée en membrane plasmique via son ancre GPI permettraient d'attacher l'HA à la surface de la cellule. Les cavéoles qui sont des invaginations de la membrane plasmique riches en cholestérol et en gangliosides et qui appartiennent aux radeaux lipidiques sont particulièrement riches en complexes HA-CD44-Hyal-2. L'HA serait dès lors clivé par Hyal-2 en fragments de taille intermédiaire d'environ 20kDa qui seraient ensuite internalisés par endocytose médiée par un récepteur avant d'être libérés au niveau de l'endosome et du lysosome. Puis, Hyal-1 et deux sortes de  $\beta$ -exoglycosidases lysosomales, les  $\beta$ -glucuronidases et les  $\beta$ -N-acétylglucosaminidases, pourraient dégrader l'HA en tétrasaccharides au niveau du lysosome (Csoka et al., 2001 ; Stern, 2004 ; Udabage, 2005) (**Figure 9**). Les monosaccharides produits par le catabolisme de l'HA, c'est-à-dire, la N-acétylglucosamine et l'acide glucuronique, pourraient alors diffuser du lysosome vers le cytoplasme. La N-acétylglucosamine serait ensuite phosphorylée en N-acétylglucosamine-6-phosphate avant d'être désacétylée par une N-acétylglucosamine désacétylase qui est une enzyme particulièrement active dans les cellules de Kuppfer ainsi que dans les cellules endothéliales du foie. Le produit final serait, ainsi, de la glucosamine-6-phosphate (Stern, 2004).

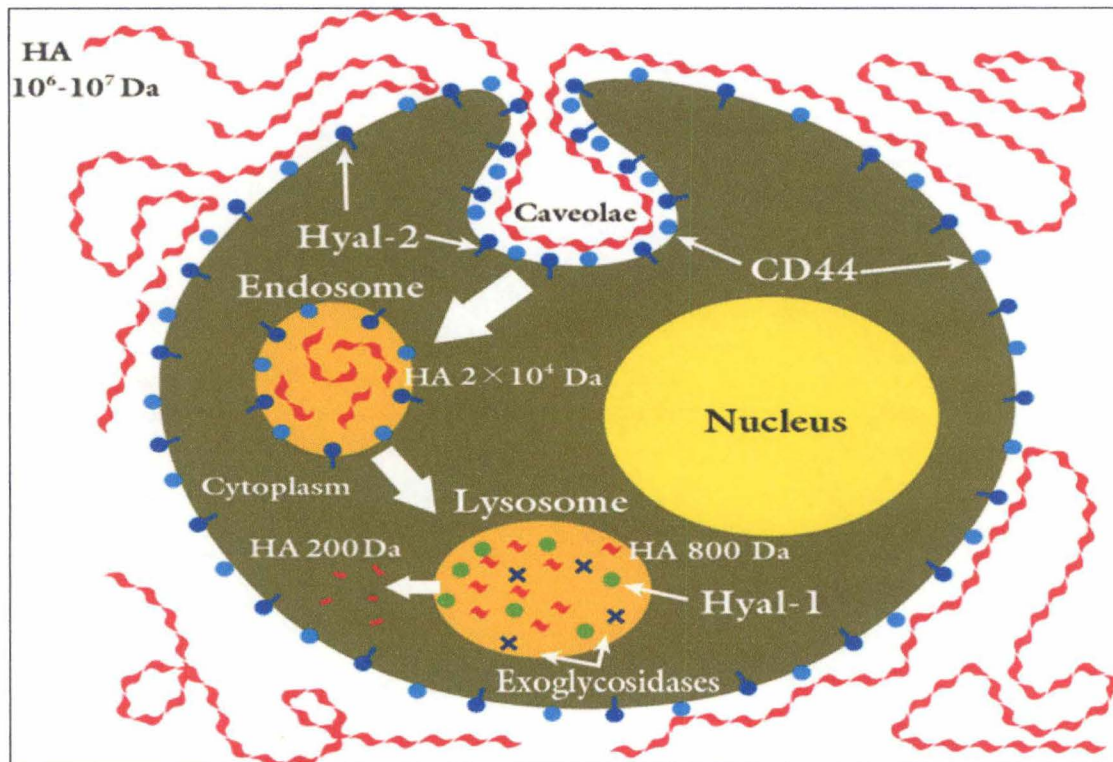


Figure 9 : Schéma hypothétique de la dégradation du HA (D'après Stern et Csoka, 2004).

#### Processus de dégradation non enzymatique de l'HA

Une fragmentation de l'HA peut également avoir lieu en présence de radicaux libres sous conditions oxydatives. Les radicaux libres et les hyaluronidases peuvent coordonner leurs activités de scission de la chaîne d'HA dans certaines conditions pathologiques. En effet, *in vitro*, des substances telles que les sels ferreux, la cystéine ou encore l'acide ascorbique sont capables de dégrader l'HA en absence ou présence de peroxyde d'hydrogène. Ces radicaux libres et plus spécialement les radicaux hydroxyles de par leur haute réactivité sont impliqués dans cette dégradation (Uchiyama et al., 1990). Ces radicaux peuvent par exemple être générés dans les premières étapes de cicatrisation en présence de myéloperoxydases des leucocytes polymorphonucléaires (Stern, 2004).

Les expériences réalisées au cours de ce mémoire s'inscrivent dans un projet de recherche qui s'intéresse aux mécanismes physiopathologiques de l'insuffisance rénale aiguë (IRA), consécutive à une ischémie/reperfusion (I/R) et particulièrement au rôle de l'HA dans ces mécanismes. Afin de contribuer de manière effective à ce projet, nous nous sommes intéressés dans ce travail au métabolisme de l'HA et plus précisément à l'une de ses enzymes de dégradation, Hyal-1, en bénéficiant des avantages de la transgénèse par l'utilisation d'animaux KO pour cette enzyme.

### **III. L'insuffisance rénale et l'ischémie/reperfusion (I/R)**

Classiquement, on distingue l'insuffisance rénale aiguë (IRA) de l'insuffisance rénale chronique (IRC). De façon générale, l'IRA se caractérise par l'incapacité du rein à accomplir de manière appropriée la filtration du plasma et les diverses fonctions tubulaires ainsi que par une détérioration de sa régulation hémodynamique. Il en résulte une augmentation de l'urémie, de la créatininémie et souvent une rétention d'eau et d'électrolytes dans le sang et les fluides extracellulaires. Les symptômes de l'insuffisance rénale ne se manifestent qu'assez tardivement car certains néphrons peuvent s'hypertrophier et gagner en efficacité à mesure que d'autres vont cesser de fonctionner. Contrairement à l'IRC, l'IRA peut être réversible.

L'insuffisance rénale peut être qualifiée de différentes manières suivant son origine :

- l'insuffisance pré-rénale : ce type d'insuffisance rénale est caractérisée par des tubules et glomérules rénaux intacts mais la clairance est limitée par des facteurs qui compromettent la perfusion rénale ;

- l'insuffisance post-rénale : ce dysfonctionnement est dû à une obstruction des voies excrétrices ;

- l'insuffisance intrinsèque : dans ce cas-ci, l'insuffisance rénale résulte d'altérations primaires intrarénales telles que des altérations de la circulation rénale ou des glomérules, des atteintes toxiques ou ischémiques, ou des inflammations tubulo-interstitielles (Kieran et al., 2003).

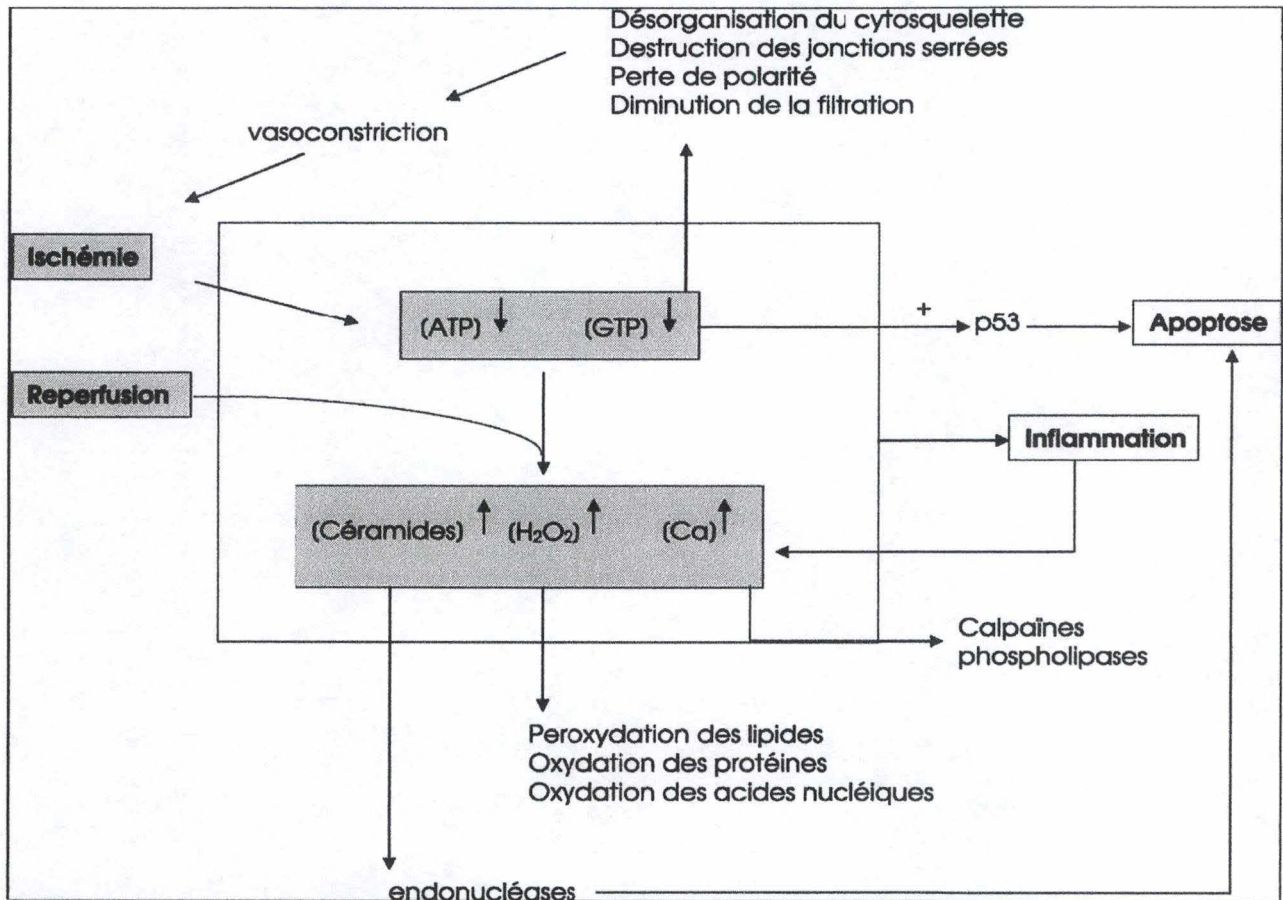
L'insuffisance rénale peut donc être induite par de nombreux facteurs. Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'insuffisance rénale induite par un épisode d'I/R. Celui-ci soumet le tissu rénal à un stress oxydatif et déclenche une première phase d'insuffisance rénale aiguë. Le rein subit, dès lors, des changements morpho-fonctionnels. Cependant, ces processus qui, à terme, visent la régénération complète du rein, peuvent devenir délétères et conduire au développement d'une fibrose tissulaire et à la perte de la fonction rénale.

L'I/R est en effet l'un des problèmes cliniques majeurs du rein. Elle survient notamment, et par la force des choses, lors des transplantations rénales, menant à des lésions parfois sévères du ou des organe(s) implanté(s). Elle est également fréquente lors des états de choc ou d'insuffisance circulatoire majeure. L'IRA consécutive à une I/R se révèle d'origine multifactorielle dans la plupart des cas cliniques et, à l'heure actuelle, reste un problème clinique majeur entraînant le décès de nombreux patients (Soullier et al., 2005).

Afin d'appréhender les processus physiopathologiques impliqués dans l'induction et la progression de cette insuffisance rénale, des modèles expérimentaux ont été développés chez l'animal. Ils consistent principalement à interrompre transitoirement le flux sanguin rénal pendant une durée déterminée, soit de manière bilatérale (Chatterjee et al., 2004), soit unilatérale, associée (Basireddy et al., 2006) ou non (Matthys et al. 1983) à une néphrectomie contralatérale. Parmi ces modèles expérimentaux, nous avons utilisé celui de l'ischémie unilatérale associée à l'ablation du rein contralatéral, un modèle qui peut être appliqué chez le rat ou la souris comme l'a notamment montré un travail de mémoire antérieur réalisé à l'Université de Mons-Hainaut (Vasseur, 2005).

## A. LES LESIONS INDUITES PAR L'I/R

L'ischémie rénale induite par l'interruption totale de la perfusion du rein a pour conséquence directe d'exposer le tissu à une hypoxie (Paller, 1994). Celle-ci induit de multiples altérations morpho-fonctionnelles se caractérisant par des dysfonctionnements vasculaires, hémodynamiques et tubulaires ainsi que par de l'inflammation tissulaire. Le schéma de la **Figure 10** illustre quelques-uns des effets engendrés par l'ischémie et la reperfusion.



**Figure 10** : Schéma illustrant différents effets induits par l'ischémie et la reperfusion (D'après Soullier, 2005).

### Les dysfonctionnements vasculaires et les implications inflammatoires

L'une des principales altérations fonctionnelles caractérisant l'IRA est un déséquilibre entre la synthèse d'agents vasoconstricteurs comme l'angiotensine II, le thromboxane A<sub>2</sub> ou encore les leucotriènes et celle d'agents vasodilatateurs comme les prostaglandines. En 1995, Conger et son équipe ont en effet démontré que les artérioles afférentes (Soullier et al., 2005) des reins ischémiés étaient plus réactives aux agents vasoconstricteurs qu'aux agents vasodilatateurs (Bonventre et al., 2003). Cette modification hémodynamique perpétue dès lors l'hypoxie tissulaire (Oken, 1984).

Dans ces conditions, les cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires subissent des dommages structuraux et biochimiques pouvant entraîner leur mort par nécrose ou par apoptose. De plus, ces lésions endothéliales sont associées à une augmentation de la

production des molécules d'adhésion telles que les intégrines, les sélectines, la molécule d'adhésion intracellulaire-1 (ICAM-1), la molécule d'adhésion des cellules vasculaires (VCAM) ou encore les P-sélectines (Bonventre et Zuk, 2004). Cette surexpression de molécules d'adhésion va permettre l'interaction des leucocytes activés avec ces cellules. Par exemple, l'expression de la protéine MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), responsable du recrutement des leucocytes induite par NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B), induit à son tour une réaction inflammatoire (Sung et al., 2002). Il s'ensuit une migration transendothéliale des leucocytes au niveau des sites inflammatoires. Néanmoins, ce phénomène d'interaction peut provoquer l'obstruction des vaisseaux de plus petit calibre (Bonventre, 1993) par «trapping» des monocytes, des polymorphonucléaires (PMN) et des plaquettes.

Des études ont montré que, outre les PMN et les macrophages, les lymphocytes T Helper et les lymphocytes T suppresseurs/cytotoxiques étaient capables de s'infiltrer (Takada et al., 1997). Ces cellules participent évidemment au processus inflammatoire en sécrétant notamment des espèces actives de l'oxygène, des cytokines pro-inflammatoires et des facteurs de croissance (Ysebaert, 2000). Néanmoins, leur présence en quantité importante au moment des processus de régénération après une ischémie suggère que ces cellules jouent un rôle dans les mécanismes de réparation (Ysebaert, 2000). En effet, les macrophages permettent la phagocytose des cellules apoptotiques et des débris nécrotiques (Rabb et al., 1997). De plus, toutes ces cellules sont une source importante de synthèse de facteurs de croissance (Verstrepen et al., 1993).

### **Les dysfonctionnements tubulaires**

En phase ischémique, le manque d'O<sub>2</sub> initie une réorientation du métabolisme aérobie vers un métabolisme anaérobie résultant en une rapide diminution du taux d'ATP (adénosine triphosphate). Il semble que le segment S3 du tubule proximal au niveau de la médullaire externe soit le segment le plus touché lors de l'I/R, en raison de sa faible capacité à produire de l'ATP par glycolyse. Toutefois, cette question reste débattue (Lieberthal et al., 1998). Le manque d'ATP contribue de manière significative aux lésions via le dysfonctionnement des enzymes ATP-dépendantes comme les pompes Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPases et Ca<sup>++</sup>-ATPases (Bonventre, 1993). Cette déplétion en ATP entraîne également une désorganisation du cytosquelette ayant pour conséquence la destruction des jonctions serrées (Soullier et al., 2005) ainsi que des changements dans la localisation des molécules d'adhésion cellulaire et des protéines membranaires polarisées (Molitoris et Maris, 1999). Il s'ensuit une perte de la bordure en brosse des cellules épithéliales tubulaires proximales et de la polarité cellulaire. Cette perte de polarité provoque par rétrocontrôle une vasoconstriction des artères afférentes ainsi qu'une chute de la filtration glomérulaire, renforçant ainsi l'ischémie au moins dans certaines zones de l'organe (Alejandro et al., 1995). La désorganisation du cytosquelette a d'ailleurs été mise en évidence par des études microscopiques au niveau des artères, des artérioles et des vasa recta (Soullier et al., 2005).

Cette perturbation des interactions cellules-cellules et cellules-substrat provoque un tableau bien connu, celui de la nécrose tubulaire aiguë induisant la mort des cellules par nécrose ou apoptose. Ce processus est caractérisé par l'exfoliation des cellules tubulaires et l'apparition de portions de membranes basales dénudées. Les débris cellulaires s'accumulent et forment dès lors des amas qui obstruent la lumière du tubule. Ce phénomène provoque une augmentation de la pression intra-tubulaire facilitant le transfert du liquide vers l'espace interstitiel, ce qui favorise le développement d'un œdème tissulaire (Bonventre, 1993).

Les taux d'ATP et de GTP (guanosine triphosphate) vont aussi être déterminants pour le devenir de la cellule lors de l'I/R. En effet, si une forte déplétion en ATP induit la nécrose cellulaire, une forte déplétion en GTP induit l'apoptose (Bonegio et al., 2002). De plus, il semble que lors de la reperfusion, un ensemble de signaux pro- et anti-apoptotiques se mélangent et que l'inflammation tend à engager les cellules vers la mort en favorisant le poids des signaux pro-apoptotiques (Soullier et al., 2005).

### **Le stress oxydatif**

L'I/R conduit à une production accrue de différents médiateurs chimiques tels que les radicaux libres sous formes de dérivés oxygénés et nitrosylés (l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle, le peroxyde nitrite, l'oxyde nitrique, ...) dont le lieu de production correspond aux zones où on observe des cellules en apoptose, processus dans lequel ils pourraient être impliqués (Chien, 2001). Ces dérivés participent également aux lésions tissulaires. Ces molécules sont générées par différents types de cellules comme les cellules parenchymateuses, les cellules de l'endothélium vasculaire, les neutrophiles ou encore les macrophages. Ceux-ci sont des acteurs majeurs de l'homéostasie de l'oxygène et du contrôle de l'expression génique au niveau cellulaire ; ils ont d'ailleurs un effet délétère lorsqu'ils sont présents à trop fortes concentrations (Higuchi et al., 2003). Cet effet comprend l'oxydation des composants cellulaires, protéiques, lipidiques et nucléaires (Weitberg et al., 1985) ainsi que la perturbation de nombreuses réactions enzymatiques (Kako et al., 1988). De plus, la perméabilité microvasculaire se trouve augmentée (Welbourn et al., 1991).

### **B. LA REGENERATION DU TISSU RENAL**

En conditions physiologiques, le turn-over de l'épithélium tubulaire rénal est très faible. Cependant, la prolifération des cellules tubulaires et interstitielles peut devenir importante en cas de stimulation du processus de régénération (Laurent et al., 1988 ; Nonclercq et al., 1992). En effet, dans de nombreuses conditions pathologiques, des processus de prolifération et de réparation tissulaire sont observés. Quelques heures ou quelques jours après reperfusion par exemple, les parties nécrosées sont en voie de régénération, ou sont même parfois complètement régénérées. La réparation cellulaire est placée sous le contrôle de différents facteurs comme des facteurs de croissance et des facteurs mitogéniques et se caractérise par une migration, une prolifération et finalement une différenciation cellulaire.

A l'heure actuelle, différents schémas hypothétiques peuvent être considérés afin d'expliquer les mécanismes de réparation tissulaire du rein. En effet, des études ont montré que des cellules souches de la moelle osseuse pourraient se fixer au niveau du rein et participer au repeuplement cellulaire (Kale et al., 2003). Néanmoins, ce phénomène serait marginal, les cellules épithéliales adjacentes aux parties nécrosées semblant majoritairement responsables de la régénération. Il est fort probable que des cellules souches rénales participent à la régénération (Oliver et al., 2004). L'existence de cellules souches endogènes capables de régénérer les types cellulaires de différents tissus est déjà connue dans d'autres tissus comme notamment la peau, la cornée et la prostate (Al Awquati et al., 2002). Au niveau des tubules, on a détecté l'expression de nombreux marqueurs embryonnaires ce qui indique clairement que des programmes embryonnaires sont réactivés au cours de cette phase de régénération. En effet, il semble que des cellules épithéliales s'engagent vers une voie de dédifférenciation (Bonventre et al., 2003) avant de proliférer et de migrer vers les espaces tubulaires dénudés et enfin de se redifférencier (Witzgall et al., 1994).

### C. L'INSUFFISANCE RENALE CHRONIQUE

Après une phase d'IRA, diverses adaptations morpho-fonctionnelles se manifestent en vue de régénérer le tissu rénal. Néanmoins, la restauration du débit sanguin rénal, la récupération de la fonction rénale ainsi que la régénération du tissu rénal peuvent rester incomplètes de telle sorte que l'animal évolue vers un stade d'IRC caractérisée par une dégénérescence tubulaire, une détérioration de la fonction rénale ainsi que de la fibrose tissulaire. Certains tubules très altérés n'ayant plus la capacité de régénérer peuvent évoluer en tubes atrophiés ou kystiques. Ces tubules, à long terme, sont généralement entourés par des amas interstitiels ainsi que par un dépôt de matériel fibreux. Finalement, une augmentation de la synthèse de matériel extracellulaire induit la fibrose tubulo-interstitielle. Outre la diminution du nombre de néphrons fonctionnels, cette fibrose s'accompagne d'une diminution du nombre de capillaires médullaires, provoquant le dysfonctionnement de la fonction rénale à long terme (Basile et al., 2001).

## 2. BUTS ET DEMARCHE DU MEMOIRE

Ce mémoire s'inscrit dans un projet de recherche plus large étudiant la matrice extracellulaire après un épisode d'I/R rénale, et principalement un constituant majeur de la matrice, l'HA. Des études précédentes réalisées dans notre laboratoire chez le rat mâle ont permis de montrer des dépôts très importants d'HA dans toutes les zones du rein à partir de 12 heures après l'épisode d'I/R (Declèves et al., 2006). Ces dépôts étaient accompagnés d'une surexpression du récepteur de l'HA appelé CD44 ainsi que d'une diminution transitoire de l'activité hyaluronidasique, exclusivement entre la 12<sup>ème</sup> et la 48<sup>ème</sup> heure après I/R (résultats non publiés). L'activité hyaluronidasique récupérait ensuite. La diminution d'une partie de l'activité hyaluronidasique a été constatée sur une zymographie réalisée avec un substrat d'HA, dans la mesure où une seule des deux bandes d'activité, celle qui est située à un PM d'environ 70 kDa, disparaissait transitoirement après I/R tandis que l'autre, de PM plus élevé (environ 95kDa), persistait. La question se pose de savoir si la bande qui disparaît correspond ou non à l'hyaluronidase tissulaire la plus active, Hyal-1. Cependant, les tentatives de quantifier Hyal-1 dans le rein de rat au moyen d'anticorps ont échoué jusqu'ici.

Notre travail va donc se concentrer sur un point précis, l'intervention d'Hyal-1 dans la phase post-ischémique précoce. Pour cela, nous exploiterons notamment un élevage de souris KO pour l'enzyme Hyal-1 disponible dans l'Unité de Recherche en Physiologie Moléculaire (URPhyM).

La première partie du mémoire consistera à établir les différents groupes expérimentaux nécessaires aux expériences. Le génotypage des souris provenant d'un élevage de souris C57bl/6 KO pour le gène *Hyal-1* croisées avec des souris WT est requis pour sélectionner les individus KO que nous pourrions utiliser dans les expériences ultérieures. D'autre part, des souris WT devront être soumises à l'ischémie et leur rein sera prélevé 24 heures ou 7 jours après la reperfusion. Les expériences d'I/R seront réalisées en collaboration avec le service de physiologie de l'Université de Mons-Hainaut.

La deuxième partie de ce travail consistera à mettre au point les conditions de zymographie pour le rein de souris mâle WT et à vérifier si cet organe possède le même profil d'activité hyaluronidasique que celui du rat (à savoir une double bande). Si la comparaison entre le rat et la souris WT est satisfaisante, nous nous tournerons alors vers la souris mâle KO pour le gène *Hyal-1* pour savoir si la bande d'activité inférieure en zymographie correspond bien à l'enzyme Hyal-1, qui doit disparaître chez l'animal KO.

Un autre aspect de ce mémoire visera à mettre en évidence la protéine Hyal-1 elle-même dans le rein de souris. A cette fin, différents anticorps seront testés en suivant la technique de western blot.

Enfin, la dernière étape du travail sera d'étudier l'évolution de l'expression génique d'*Hyal-1* dans les différentes zones du rein après I/R, via la technique de RT-PCR quantitative en temps réel.

Ces résultats devraient nous fournir des renseignements intéressants concernant l'importance de l'enzyme Hyal-1 dans le modèle d'I/R rénale chez le rat et la souris.

### **3. MATERIEL ET METHODES**

#### **I. Le modèle expérimental**

Pour ce travail, des souris mâles C57bl/6 (d'un poids compris entre 20 et 25g) wildtype (wt) ou KO pour le gène Hyal-1 ont été utilisées. Les souris KO ont été générées par insertion par recombinaison homologue d'un gène de résistance à la néomycine dans l'exon 1b du gène Hyal-1 induisant ainsi la délétion de celui-ci. Ces souris KO sont élevées dans une enceinte dont l'air est filtré afin de diminuer les risques d'infection, ces souris ayant été décrites comme plus sensibles aux infections.

#### **A. PREPARATION DES GROUPES EXPERIMENTAUX ET DES ECHANTILLONS**

Deux groupes expérimentaux ont été réalisés : un groupe test où les animaux ont subi une ischémie-reperfusion (groupe IR) et un groupe contrôle n'ayant pas subi d'ischémie (groupe CTL). Le modèle d'ischémie-reperfusion ayant été mis au point lors d'une étude précédente (Mémoire de Marie Vasseur, 2005), nous avons décidé de prélever les organes des animaux ischémiés à différents temps après l'intervention soit 24heures (IR 24h) ou 7 jours (IR 7jr).

##### **Souris non soumises à l'ischémie-reperfusion**

Les souris contrôles ont tout d'abord été euthanasiées par dislocation cervicale ou par injection intrapéritonéale d'une dose de Nembutal (0,05 ml pour un animal de 30g). L'animal est ensuite disséqué et les organes sont prélevés. Ils sont utilisés soit directement utilisés pour une expérience soit conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  (ou dans de l'azote à  $-80^{\circ}\text{C}$ ).

##### **Souris soumises à l'ischémie-reperfusion**

Les souris tests soumises à une ischémie-reperfusion sont tout d'abord anesthésiées à l'aide d'une injection intrapéritonéale d'une solution de Kétamine (100 mg/kg) (KETALAR, Pfizer, Irlande) –Xylazine hydrochloride (10 mg/kg) (MP Biomedicals, USA).

Une fois anesthésiées, l'abdomen est rasé et désinfecté à l'aide d'une solution d'eau contenant du détol. L'expérience se déroule sur une plaque chauffante maintenant la température corporelle de l'animal entre  $37^{\circ}\text{C}$  et  $38^{\circ}\text{C}$ . L'animal est ensuite disséqué. Le pédicule rénal droit est ligaturé puis le rein droit est prélevé et conservé dans l'azote. Un clamp microvasculaire (FST, Germany) est ensuite placé au niveau du pédicule rénal gauche de l'animal étant donné que la veine et l'artère ne sont pas facilement dissociables chez la souris. Ce clamp est maintenu en place pendant 30 minutes puis celui-ci est ôté et, après avoir vérifié que la reperfusion du rein gauche est correcte, l'animal est recousu. La plaie est alors recouverte d'un agent antiseptique pour éviter tout risque d'infection. Les animaux passent ensuite une nuit en salle de réveil avant d'être reconduits le lendemain à l'animalerie. 24 heures ou 7 jours après l'ischémie-reperfusion, les souris recevront une injection intrapéritonéale létale de Nembutal (soit 0,03ml pour une souris de 30g) et le rein gauche sera prélevé et conservé dans l'azote.

## **Préparation des échantillons**

Lors de son prélèvement, le rein est conservé entier ou disséqué en ses différentes zones : cortex, OSOM, ISOM et médullaire interne. La dissection se fait sur glace afin de conserver au maximum le tissu et les activités enzymatiques. Dans le cas où l'ARN doit être extrait du tissu, l'expérience est réalisée en conditions RNase free.

### Homogénéisation des tissus

Deux solutions différentes ont été testées pour homogénéiser les tissus :

- soit dans une solution de sucrose 0,25M +inhibiteurs de protéases (1pastille pour 50 ml de solution) (Complete, protease inhibitors)
- soit dans une solution NaCl 0,15M, SDS 0,1% + inhibiteurs de protéases (1pastille pour 50ml de solution).

Dès leur prélèvement, les tissus ont été pesés et ensuite homogénéisés à l'aide d'un potter dans 250 µl de solution d'homogénéisation pour 50mg de tissu.

### Homogénéisation de cellules Cos

Des cellules Cos connues pour avoir une activité Hyal-1 importante ont été utilisées comme contrôle positif dans la technique de zymographie. Ces cellules ont été cultivées dans une boîte T75. Une fois à confluence, elles ont été rincées 5x dans du PBS (phosphate buffer saline) glacé, grattées et prélevées dans 2x3ml de PBS. La solution a ensuite été centrifugée à 800 rpm pendant 5minutes, le surnageant a été décanté et le culot a été homogénéisé à l'aide d'un potter dans une solution de sucrose 0,25M contenant de l'imidazole 3mM pH7,4 et des inhibiteurs de protéases (1pastille pour 50ml de solution). Le culot a été repris dans 2x1ml d'une solution de sucrose 0,25M contenant des inhibiteurs de protéases (1pastille pour 50ml de solution) et de l'imidazole 3mM pH7,4. La solution a été aliquotée avant d'être congelée pour éviter les multiples décongelations et la perte d'activité enzymatique lors des utilisations ultérieures.

### Dosage des protéines

Pour chaque tissu prélevé, la concentration en protéines a été déterminée par la technique décrite initialement par Bradford (Bradford, 1976) au moyen d'un kit BIO-RAD (BIO-RAD protein assay). Ce kit permet de doser de manière colorimétrique les protéines contenues dans les extraits tissulaires. La solution de ce kit contient de l'acide phosphorique, du méthanol et du bleu brillant de Coomassie G-250 ayant une absorbance à 595nm.

Un étalon de BSA (Bovine Serum Albumin 0,1 mg/ml) est utilisé afin de déterminer la concentration en protéines en fonction de l'absorbance détectée par le spectrophotomètre à 595 nm. Des quantités croissantes d'étalon sont mesurées dans un volume total de 100µl auxquels on ajoutera 900µl d'une solution contenant 200µl de « Biorad Protein Assay » et 700µl d'eau.

Pour doser les échantillons, différentes dilutions sont préparées dans un volume total de 100µl auxquels on ajoute également 900µl d'une solution « Biorad Protein Assay » et d'eau. Les valeurs d'absorbance utilisées sont celles se situant dans la même zone de lecture que celles de l'étalon.

<b>Gel de séparation</b>	<b>Gel 8 %</b>	<b>Gel 10 %</b>	<b>Gel 12%</b>
- Tris 1,5M pH 8,8 SDS 0,4%	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
- Acryl Bisacryl	2,7 ml	3,3 ml	4 ml
- HA de crête de coq (1mg/ml)	1,7 ml	1,7 ml	1,7 ml
- Eau distillée	2,6 ml	2 ml	1,3 ml
- Temed	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
- Persulfate d'ammonium 10%	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l

<b>Gel d'empilement</b>	
- Tris 0,5M pH 6,8 SDS 0,4%	1,25 ml
- Acryl Bisacryl	0,625 ml
- Eau distillée	2,75 ml
- Temed	5 $\mu$ l
- Persulfate d'ammonium	375 $\mu$ l

**Figure 11** : Composition pour deux gels d'acrylamide pour la zymographie.

## II. Etudes enzymatiques, protéiques, et génétiques

### A. METHODE RELATIVE A L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DES HYALURONIDASES, LA ZYMOGRAPHIE

#### **Principe**

La zymographie est une technique permettant de détecter l'activité des hyaluronidases dans un échantillon de protéines après séparation électrophorétique sur une matrice adéquate.

Cette technique implique tout d'abord le principe général de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Les protéines sont séparées suivant leur masse et non suivant leur charge étant donné qu'elles sont toutes chargées négativement suite à la présence de sodium dodécyl sulfate (SDS). La migration se fait de la cathode (-) à l'anode (+) et les grandes protéines migrent plus lentement que les petites. Le gel de polyacrylamide par sa structure moléculaire en réseau tridimensionnel exerce un rôle de tamis moléculaire. La dimension des pores est fonction du degré de réticulation du gel dépendant du pourcentage d'acrylamide et de NN'-méthylènebisacrylamide.

Dans le cas particulier de la zymographie, le gel de séparation est composé d'acrylamide copolymérisé avec de l'HA. De plus, les protéines ne sont que partiellement dénaturées afin de conserver leur activité enzymatique. Après migration des échantillons et incubations du gel dans différents tampons permettant à l'enzyme d'agir sur son substrat, le gel est coloré à l'aide du Stains-All qui colore le HA en bleu. Aux endroits où l'enzyme aura pu digérer son substrat, par contre, on pourra observer des zones rosées.

#### **Protocole**

##### Préparation des gels et des échantillons

La **figure 11** décrit la composition des gels utilisés en zymographie. Dans ce travail, le pourcentage d'acrylamide utilisé est habituellement le plus faible (8%).

Le matériel utilisé pour la zymographie est principalement du tissu frais ou décongelé une seule fois tout au plus afin d'éviter au maximum une perte d'activité enzymatique.

Dans chaque puits, une quantité déterminée de protéines est disposée, en général 85µg. 1/5 du volume total de l'échantillon est constitué d'une solution alourdissante 5 fois concentrée (SDS 0,1%, bleu de bromophénol 0,06%, glycérol 14%, Tris HCl 300mM pH 6,8) Dans cette technique, les échantillons ne sont ni dénaturés ni réduits afin de préserver l'activité enzymatique.

Une piste est également utilisée pour déposer 10 µl d'un marqueur de poids moléculaire « Prosieve » (Prosieve Color Protein Marker) afin de pouvoir identifier le PM de l'enzyme responsable de l'activité détectée et une autre piste contiendra 20µl d'un lysat de Cos (correspondant à 10µg) possédant une activité hyaluronidasique comme contrôle positif.

### Migration électrophorétique

Une fois les échantillons chargés sur les gels, ceux-ci sont déposés dans une cuve remplie de tampon de migration (Tris HCl 25mM, Glycine 192mM, SDS pH 8,6 0,1%) préalablement refroidi à 4°C afin de préserver l'activité de la protéine durant l'électrophorèse et la cuve est également déposée sur glace. Un agitateur est placé dans la cuve d'électrophorèse afin de permettre un bon mouvement des ions au sein du tampon de migration. La migration se déroule à 80Volts (V) et 0,01Ampères (A) pendant 5minutes puis le voltage peut être augmenté pour maintenir l'ampérage sans toute fois dépasser 130V. La migration électrophorétique dure 2h30.

### Incubation du gel

Après la migration, chaque gel est démoulé et le gel d'empilement est jeté. Chaque gel est lavé 2heures à température ambiante sur un agitateur dans 40ml d'une solution de triton X-100 3% afin d'éliminer le SDS du gel. Chaque gel est ensuite incubé 30 minutes à température ambiante dans 40 ml d'une solution formate 0,1M NaCl 0,1M pH3,7. Ensuite, chaque gel est incubé en présence de 40 ml de cette même solution fraîche pendant toute une nuit (environ 18heures) à 39°C avec agitation. L'incubation en présence de la solution de formate permet de fournir les conditions optimales à l'activité de l'enzyme. Le lendemain, le gel est rincé abondamment à l'eau avant d'être incubé dans 40 ml d'une solution de pronase 0,1mg/ml dans du tris 20mM pH8 pendant 2heures à 39°C avec agitation ce qui a pour but de digérer les protéines présentes dans le gel qui pourraient gêner la pénétration du colorant. Les gels sont ensuite rincés à l'eau avant d'être incubés dans 40 ml de formamide 50% pendant 30 minutes à température ambiante. Enfin, les gels sont incubés en présence d'une solution de coloration constituée pour un gel de 18 ml de formamide, 20ml d'eau et 2ml d'une solution stock de stainsall 0,005% et sont emballés dans de l'aluminium pour les préserver de la lumière avant leur révélation quelques jours plus tard. Le gel sera observé à la lumière en ôtant le colorant et en le remplaçant par de l'eau.

## **B. METHODES RELATIVES A LA PRESENCE DE LA PROTEINE, LE WESTERN BLOT ET LE «TRUE BLOT»**

### **Le western blot**

#### Principe

Le western blot ou immunotransfert est une des méthodes pour détecter spécifiquement une protéine parmi d'autres. Il permet d'observer si une protéine d'intérêt est présente dans un échantillon via un anticorps qui lui est spécifique et qui est lui-même reconnu par un anticorps secondaire couplé à une Horse Radish Peroxydase (HRP). C'est cette dernière qui permettra la mise en évidence de la protéine. Cette méthode, par référence à un marqueur de PM permettra aussi de déterminer la masse moléculaire de la protéine d'intérêt.

La première étape du western blot consiste en une électrophorèse sur gel d'acrylamide en présence de SDS comme c'est le cas pour la zymographie à la différence que, cette fois, l'HA n'est plus copolymérisé à l'acrylamide.

<b>Gel de séparation</b>	<b>Gel 10%</b>
- Tris 1,5M pH 8,8 SDS 0,4%	2,5 ml
- Acryl Bisacryl	3,3 ml
- Eau distillée	3,7 ml
- Persulfate d'ammonium	500 $\mu$ l
- Temed	10 $\mu$ l

<b>Gel d'empilement</b>	
- Tris 0,5M pH 6,8 SDS 0,4%	1,25 ml
- Acryl Bisacryl	0,625 ml
- Eau distillée	2,75 ml
- Temed	5 $\mu$ l
- Persulfate d'ammonium	375 $\mu$ l

**Figure 12** : Composition pour deux gels d'acrylamide pour western blot et true blot.

## Protocole

### • Préparation des gels et des échantillons

En western blot, la migration électrophorétique des échantillons a été réalisée dans ce travail sur des gels d'acrylamide 10%. **Figure 12**

Une quantité déterminée de protéines de l'échantillon contenant un homogénat tissulaire est préparée. 1/5 du volume total de l'échantillon sera composé d'une solution de bleu alourdisant 5x concentrée contenant du  $\beta$ -mercaptoéthanol 5%. Le  $\beta$ -mercaptoéthanol est utilisé pour rompre les ponts disulfures à la fois intra- et intermoléculaires, en libérant les chaînes polypeptidiques complètement dépliées. Les échantillons sont ensuite incubés 3 minutes à 100°C afin de détruire les structures tertiaires et de rompre les ponts disulfures puis ils sont centrifugés à 13000 rpm pendant une minute avant d'être déposés sur gel.

Une piste du gel contiendra 10 $\mu$ l de marqueur de PM « Prosieve » (Prosieve Color Protein Marker) afin de préciser le PM de la protéine d'intérêt.

### • Migration électrophorétique

Une fois les échantillons déposés sur gel, celui-ci est placé dans une cuve contenant du tampon de migration identique à celui utilisé en zymographie. La migration se fait à 80V pendant 10 minutes environ puis le voltage est augmenté à 100V. La migration des échantillons prend environ 1h-1h30.

### • Transfert sur membrane

Après la séparation électrophorétique, les protéines sont transférées sur une membrane Polyscreen PVDF (Poly Vinylidene DiFluoride) selon le principe du transfert semi-sec. Pour chaque gel, 4 papiers Whatman de 6,5 cmx10 cm sont placés dans une solution de transfert (Tris 25mM, glycine 192mM, méthanol 25%). La membrane Polyscreen PVDF est quant à elle placée une minute dans du méthanol 100% avant d'être rincée à l'eau distillée et d'être incubée dans une solution de transfert jusqu'à son utilisation.

Une fois la migration terminée, le gel est démoulé et un montage (une éponge, 2 papiers, la membrane, le gel, 2 papiers et une éponge) est réalisé dans la cuve de transfert. Le transfert se déroule à 8V et 250A pendant 2heures. La visualisation des bandes du marqueur coloré sur la membrane permet de confirmer que le transfert s'est bien déroulé.

### • La coloration rouge ponceau

Une coloration au rouge ponceau est réalisée afin de visualiser les protéines et de vérifier si la charge en protéines sur les différentes pistes du gel est bien équivalente. Cette coloration est réversible.

Après avoir séché la membrane à l'air libre, celle-ci est incubée 10minutes en présence de 20 ml d'une solution rouge ponceau (Sigma ; Rouge Ponceau S 0,1% dans 5% d'acide acétique). Une fois la révélation terminée, la membrane est rincée à l'aide d'eau distillée et scannée.

- **Blocage des sites non spécifiques**

Cette étape a pour but de masquer tous les sites qui pourraient être reconnus par un anticorps et qui donneraient un faux signal. Ce blocage se fait dans du PBS Tween 0,1% +5% de lait. Ce blocage peut se faire pendant 2 heures à température ambiante ou une nuit à 4°C toujours sur un agitateur.

- **Incubation de l'anticorps primaire**

Un anticorps primaire est utilisé pour reconnaître la protéine d'intérêt de façon spécifique. Il est dilué pour obtenir la concentration finale voulue, dans notre cas 1/2000, dans une solution de PBS Tween 0,1% +5% de lait. L'incubation dure 1 heure à température ambiante ou une nuit à 4°C. Après l'incubation, la membrane est rincée 5 x 5 minutes à l'aide d'une solution de PBS Tween 0,1% pour enlever l'anticorps en excès.

- **Incubation de l'anticorps secondaire**

L'anticorps secondaire utilisé reconnaît spécifiquement l'anticorps primaire et est couplé à une HRP qui permettra la révélation de la protéine d'intérêt. L'anticorps secondaire utilisé pour reconnaître l'anticorps primaire est dilué pour obtenir la concentration finale voulue, dans notre cas 1/8000, dans une solution de PBS Tween 0,1% +5% de lait. L'incubation est réalisée durant 45 minutes sur un agitateur à température ambiante et est suivie de cinq lavages de 5 minutes dans du PBS Tween 0,1% pour enlever l'anticorps secondaire en excès.

- **La révélation**

La révélation se fait en chambre noire à l'aide d'un kit de chemiluminescence Perkin Elmer. Ce kit contient du luminol et de l'eau oxygénée. La peroxydase qui est couplée à l'anticorps secondaire va catalyser l'émission de lumière à partir de l'oxydation du luminol. L'émission de photons est détectée sur un film photographique.

Une même quantité de 2 réactifs A et B sont mélangées et mises en présence de la membrane pendant une minute, après quoi on enlève la solution. La membrane est ensuite placée dans une cassette et mise plus ou moins longtemps en présence d'un film photographique (Kodak Biomax). Ensuite, le film est développé.

## **Le « true blot », cas particulier du western blot**

### Principe

Dans le cas d'un anticorps primaire murin utilisé pour reconnaître Hyal1 dans du tissu murin, un anticorps true blot est utilisé afin d'éviter que l'anticorps secondaire habituel ne reconnaisse les immunoglobulines murines intrinsèques au tissu. En effet, l'anticorps secondaire « True blot » a la particularité de ne reconnaître que les immunoglobulines non dénaturées.

### Modifications par rapport au western blot

Le blocage se réalise cette fois-ci avec dans du Tampon A (25 mM Tris HCl, pH 7,3, 0,15 M NaCl, 0,1% Tween-20) + lait 5% toute la nuit à 4°C sur un agitateur.

L'incubation avec l'anticorps primaire est réalisée dans 5% de lait dilué dans du tampon A sur un agitateur à température ambiante pendant 2 heures.

Les lavages sont également effectués dans un tampon différent (10% de tampon A+ 0,1% Tween dans de l'eau distillée) à raison de 10 lavages de 6 minutes.

L'incubation avec l'anticorps secondaire « True-blot » anti-souris couplé à une peroxydase se fait dans du tampon A + lait 5% pendant une heure à température ambiante.

## **C. METHODES RELATIVES A L'ADN**

### **Le génotypage**

Cette technique permet de déterminer le génotype de souris afin d'identifier si elles sont KO, hétérozygotes (HZ) ou sauvages pour le gène *Hyal1*. La présence d'un ou des deux allèles mutés pour le gène est détectée à partir d'un fragment de queue de la souris.

### Méthode d'extraction de l'ADN

Un fragment de queue de souris d'une taille de quelques mm est prélevé et est incubé dans 150 µl de solution de lyse (Tris pH 8 100 mM, EDTA (acide éthylène-diamine-tétraacétique) 1mM, NaCl 100 mM, SDS 1%, Proteinase K 100 µg/ml) pendant une nuit à 50°C. L'extraction de l'ADN est réalisée en ajoutant 150 µl de phénol-chloroforme ce qui a pour but de séparer l'ADN des protéines et des sels contenus dans l'échantillon grâce aux deux phases qui se déterminent dans l'échantillon suite à une centrifugation de 10 minutes à 13 000 rpm. Dix µl d'ADN purifié se trouvant dans la phase aqueuse sont alors dilués dans 90µl d'eau stérile.

### La Polymerase Chain Reaction ou PCR

#### • Principe

La PCR permet d'amplifier de manière exponentielle une séquence particulière d'ADN à partir d'un ADN cible et d'amorces qui vont s'hybrider de part et d'autre de la séquence. Une amorce va se fixer sur le brin sens et l'autre sur le brin anti-sens. En vue d'amplifier la séquence d'ADN désirée, celle-ci sera mise en présence des deux amorces, de l'ADN polymérase qui est thermorésistante ainsi que de son tampon et des 4 bases nucléotidiques (dNTP). L'échantillon sera soumis, dans notre cas, à 35 cycles chacun divisé en trois étapes afin d'obtenir un grand nombre de copies de la séquence d'intérêt.

- La première étape est la dénaturation et consiste en la séparation des deux brins d'ADN de la séquence d'intérêt afin de permettre par la suite l'hybridation des amorces.

<b>Pour un tube PCR de 20 µl</b>	
- Tampon 5X green	4 µl
- dNTP	0,4 µl
- Taq polymérase	0,1 µl
- Oligonucléotide sens	1 µl
- Oligonucléotide anti-sens	1 µl
- Eau distillée	11,5 µl
- ADN	2 µl

**Figure 13 :** Tableau récapitulatif de la préparation d'un mix PCR.

Nom de l'amorce	Séquence	Taille du fragment amplifié
sHyal1KO610	5'-CTTGGGTGGAGAGAGGCTATTC-3'	280 pb
sHyal1KO611	5'-AGGTGAGATGACAGGAGATC-3'	
sHyal1KO612	5'-CTGGGACAGCAAGGACATTT-3'	340 pb
sHyal1KO613	5'-CAGTGCTGCAGGCAAATAAA-3'	

**Figure 14 :** Tableau des amorces utilisées pour le génotypage et de leurs caractéristiques.

- Au cours de la deuxième étape appelée l'hybridation, la température est diminuée pour devenir spécifique à la température de melting des amorces afin que celles-ci puissent s'hybrider au niveau de leur séquence homologue. Cette température dépend de la composition des amorces.

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = ([\text{nombre de A et de T}] \times 2^{\circ}\text{C}) + ([\text{nombre de C et G}] \times 4^{\circ}\text{C})$$

- Enfin, lors de l'étape d'élongation, la polymérase ajoute des nucléotides aux extrémités 3' des amorces pour les allonger. La température de cette phase est de 72°C et sa durée dépendra de la longueur du fragment à amplifier.

### • Méthode

Le mélange des différents réactifs est réalisé. (**Figure 13**) Deux couples d'amorces ont été utilisés afin de vérifier l'amplification d'une part du gène *Hyal-1* et d'autre part du gène de résistance à la néomycine (**Figure 14**). L'amplification est réalisée aux températures suivantes dans un thermocycler « Perkin Elmer » pour les deux couples d'amorces :

Amorces pour le gène Hyal1 (35 cycles)		Cycles			
Température	94°C	94°C	52°C	72°C	72°C
Temps	5 min	1 min	1 min	1 min	7 min

Amorces pour le gène de résistance à la Néomycine (35 cycles)		Cycles			
Température	94°C	94°C	61°C	72°C	72°C
Temps	5 min	1 min	1 min	1 min	7 min

**Figure 15** : Tableau récapitulatif des différentes températures et cycles de la PCR.

### La migration sur gel d'agarose

#### • Principe

L'électrophorèse sur gel d'agarose va permettre de séparer les acides nucléiques suivant leur PM. Les échantillons d'ADN chargés négativement sont déposés dans des puits au niveau de la cathode et migreront vers l'anode sous l'influence du champ électrique et ce à une vitesse qui est propre à leur taille. Le gel utilisé (agarose 1%) contient du bromure d'éthidium qui agit comme un agent intercalant au niveau de la double hélice d'ADN et émet de la fluorescence lorsqu'on l'expose aux rayons ultraviolets ce qui permet la visualisation de l'ADN sur le gel.

#### • Méthode

Pour réaliser un gel contenant 1% d'agarose, 1 gramme d'agarose (BIO-RAD) est solubilisé dans 100 ml de tampon TAE ou Tris-acétate EDTA (Tris 40 mM pH 7,2, acétate de sodium 20mM, EDTA 1mM ) et est porté à ébullition au micro-onde. Ensuite, 5 µl de bromure d'éthidium sont ajoutés et le gel est coulé dans un moule de plexiglas. Les peignes qui permettront la formation des puits nécessaires au dépôt des échantillons sont alors placés. Une fois le gel polymérisé, celui-ci est déposé dans une cuve remplie de tampon TAE et les

échantillons ayant subi l'amplification PCR sont déposés dans les puits à raison de 10 µl par puits. Notons que la solution alourdissante est déjà présente dans le mix PCR. Dans un puits on veillera également à déposer 5 µl d'un marqueur de taille (Smart Ladder) afin de déterminer, après migration, la taille des fragments qui ont été amplifiés. La migration est réalisée à 90 V pendant un peu moins d'une heure.

Les bandes d'ADN amplifiées et marquées par le bromure d'éthidium sont visualisées à l'aide de rayons ultraviolets (UV) dont la longueur d'onde est de 302 nm via un transilluminateur et le résultat est photographié.

## **D. METHODES RELATIVES A L'ARN**

### **Extraction d'ARN**

Afin d'analyser la présence de messagers, une extraction d'ARN est réalisée en suivant le protocole du Mini-Kit RNeasy de Qiagen ou Amersham. Cette méthode nécessite de travailler dans des conditions Rnase Free et sur glace lors du prélèvement des tissus afin de ne pas dégrader l'ARN et éviter toute contamination. Avec cette méthode, le tissu est lysé à l'aide d'un tampon qui inactive immédiatement les RNases présentes au sein même du tissu et fournit les conditions adéquates pour l'adsorption de l'ARN sur la colonne du kit. Deux étapes simples de lavage avec deux tampons différents enlèvent ensuite les sels, les métabolites et autres composants cellulaires. Enfin, l'ARN purifié est élué à l'aide d'eau RNase free.

### **Dosage**

Pour doser la quantité d'ARN obtenue, des cuvettes contenant 100µl, soit 2µl de l'échantillon et 98µl d'eau, sont préparées. L'absorbance de chaque cuvette est alors lue à l'aide d'un spectrophotomètre UV à 260nm ce qui permettra de connaître la concentration en ARN de l'échantillon. En effet, pour 100µl, une densité optique de 1 correspond à 4µg d'ARN. L'ARN peut ensuite être stocké à -80°C. L'absorbance des protéines est également lue à 280nm afin de calculer un ratio qui nous permet d'évaluer la qualité de la purification de notre échantillon.

### **Migration sur gel**

La migration sur gel d'agarose 1% a pour but de vérifier l'intégrité de l'ARN. Le gel se prépare comme décrit précédemment. Chaque échantillon qui sera déposé sur le gel aura un volume final de 20µl. Il contiendra 1µg d'ARN dans de l'eau distillée et 2µl de bleu 10x concentré. La migration se déroule à 80V pendant un peu moins d'une heure et la visualisation se fait au moyen des UV comme pour l'ADN.

### **La PCR quantitative en temps réel**

Cette technique permet de quantifier un ARNm donné en réalisant préalablement une étape de transcription inverse. Cette transcription inverse est réalisée à l'aide d'une reverse transcriptase qui va synthétiser un brin d'ADN complémentaire (ADNc) à un brin d'ARN monocaténaire en allongeant l'extrémité 3'OH d'une amorce nucléotidique d'une dizaine de paires de bases. Ensuite, la PCR va amplifier de manière exponentielle cet ADNc.

Pour un tube RT-PCR de 20µl	
- Tampon RTB 5X	4 µl
- dNTP 25 mM	1 µl
- DTT 0,1M	2 µl
- Primers 0,3 µg/µl	0,5 µl
- RNasine 40U/ µl	1 µl
- MLV RTase 200 U/ µl	1 µl

Figure 15 : Tableau récapitulatif d'un mix RT-PCR.

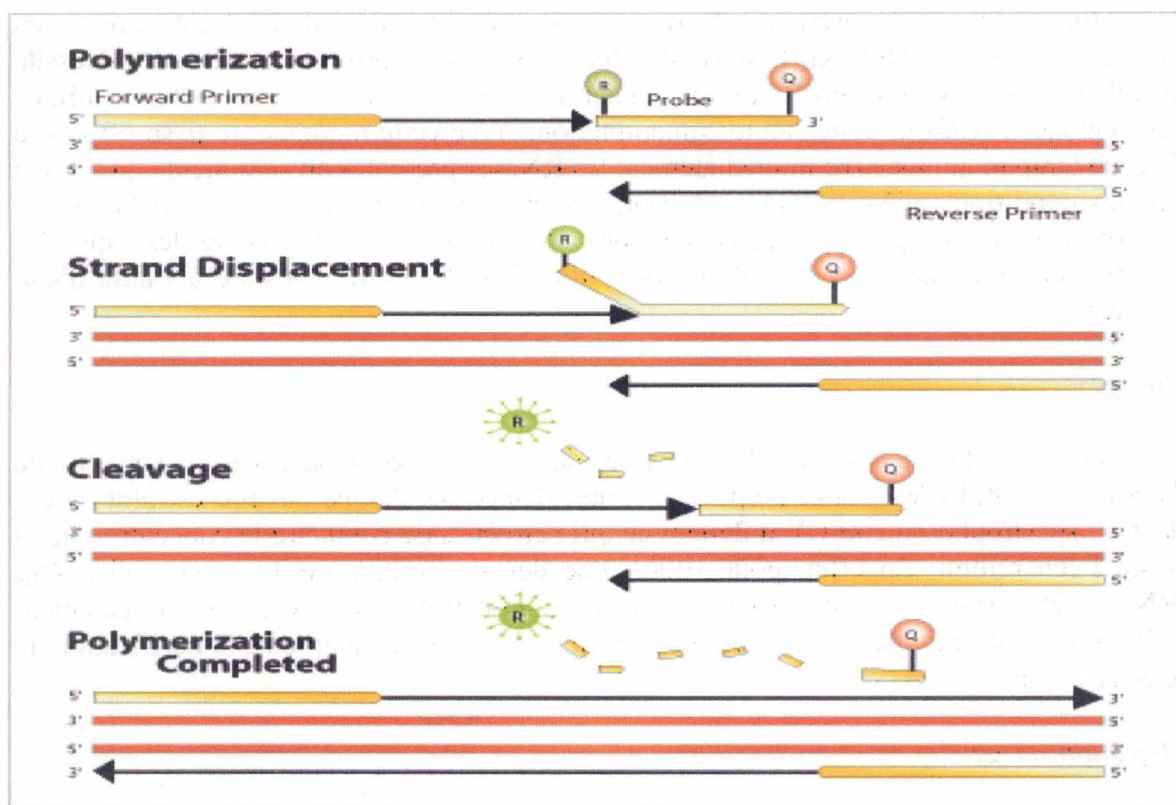


Figure 16 : Schéma explicatif du déroulement de la RT-PCR en temps réel avec une sonde Taqman.

Pour un mix de 18,5µl	
- Master mix 2X	10 µl
- Eau RNase free	7,5 µl
- Primer	1 µl

Figure 17 : Tableau récapitulatif d'un mix nécessaire la PCR quantitative.

## Transcription inverse

- **Principe**

Cette étape permet l'obtention du cDNA nécessaire à la PCR ultérieure à partir d'ARNm. L'ARNm est tout d'abord dénaturé à haute température avant d'être mis en présence des composants nécessaires à sa rétro-transcription.

- **Méthode**

La première étape consiste à prélever 2µg d'ARN et de porter son volume à 10,5 µl à l'aide d'eau RNase free. L'échantillon ainsi constitué sera soumis à 65°C pendant 8 minutes dans le Thermocycler Perkin Elmer afin de dérouler l'ARNm. Pour un même échantillon, cette étape est réalisée en double.

Ensuite, on ajoute à l'échantillon un mix de 9,5µl (**Figure 15**). Dans un premier cas, le mix contiendra l'enzyme nécessaire à la rétro-transcription et, dans un deuxième cas, l'enzyme sera remplacé par de l'eau RNase free afin de vérifier que l'échantillon n'est pas contaminé par de l'ADN. Les échantillons qui ne sont pas mis en présence de la RTase sont conservés sur glace. Par contre, les échantillons mis en présence de la RTase sont centrifugés une minute à 13 000 rpm avant d'être laissés 10minutes à 25°C. Ils sont ensuite soumis 50 minutes à 42°C et 15minutes à 70°C dans le Thermocycler Perkin Elmer. Cette étape terminée, l'échantillon de 20 µl sera divisé en 2 aliquots et chacun sera porté à un volume de 100µl avec de l'eau RNase free. Un aliquot de 100 µl sera encore aliquoté et conservé à -20°C tandis que l'autre sera utilisé pour la PCR quantitative en temps réel.

## PCR quantitative en temps-réel Taqman

- **Principe**

Cette technique consiste à suivre en temps réel l'amplification d'un fragment d'ADN via l'utilisation d'une sonde fluorescente complémentaire de l'ADN d'intérêt. La sonde utilisée est une sonde Taqman dont la particularité est qu'elle possède un marqueur fluorescent à son extrémité 5' (FAM, 6-carboxyfluorescéine) et un quencher en 3' (TAMRA, 6-carboxytetrométhylrhodamine). Le quencher est un chromophore non fluorescent qui dissipe l'énergie qu'il reçoit du fluorophore lorsqu'il se situe à proximité. Lors de la progression de la polymérase, la sonde est décrochée et clivée de sorte que le fluorophore ne perçoit plus l'influence du quencher et la fluorescence est alors émise à 557 nm. (**Figure 16**)

- **Méthode**

Cette expérience se réalise sur une plaque 96 puits. Chaque puit reçoit 1,5 µl d'échantillon provenant de la rétrotranscription ainsi que 18,5 µl d'un mix (**Figure 17**). Ce mix est réalisé en 6 exemplaires pour chaque échantillon : trois réplicats contiendront les primers de notre gène d'intérêt (dans notre cas *Hyal-1*) et trois réplicats contiendront les primers d'un house keeping gene (mouse hypoxanthine phosphoribosyltransférase ou mHPRT) que l'on sait exprimé de façon constante dans tous nos échantillons. Six puits contiendront également un échantillon de référence qui est constitué d'ADN et dans lequel on sait que notre gène d'intérêt est exprimé.

Après le dépôt des échantillons, la plaque est recouverte par un film et est centrifugée à 4000 tours pendant une minute. La plaque est ensuite insérée dans une machine ABI PRISM 7500 et les paramètres suivants sont programmés : 10 minutes à 95°C et 40 cycles constitués de 15 secondes à 95°C (dénaturation) et 1 minute à 60 °C (hybridation et extension). La quantification de chaque échantillon sera permise grâce à l'établissement préalable d'une gamme étalon spécifique du gène étudié.

## 4. RESULTATS ET DISCUSSION

Les expériences réalisées au cours de ce mémoire se focalisent sur l'Hyal-1 et son impact sur l'HA dans le cadre d'un modèle d'I/R rénale. Cette étude bénéficie notamment de l'utilisation de souris transgéniques élevées au laboratoire.

### A. PREPARATION DES GROUPES EXPERIMENTAUX

#### **Le génotypage**

##### Introduction

La première approche de ce mémoire fut de pouvoir identifier le génotype de différentes souris au sein de l'élevage afin de sélectionner celles que nous pourrions utiliser dans des expériences ultérieures. En effet, l'élevage a débuté par un croisement entre un mâle KO pour le gène *Hyal-1* et une femelle WT. La portée née de ce couple ne comporte donc que des individus HZ. Une femelle HZ a été accouplée avec un mâle KO donnant ainsi théoriquement 50 % de KO et 50 % d'HZ parmi leur progéniture qui sera génotypée.

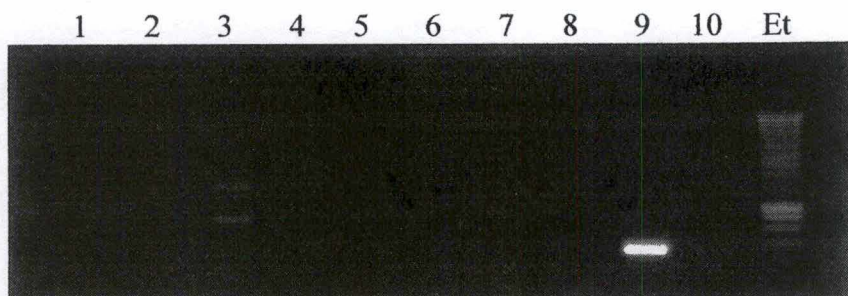
##### Conditions techniques

Pour chaque souris, 2 PCR ont été réalisées, la première avec un premier couple d'amorces destiné à mettre en évidence l'allèle *Hyal-1* qui doit être présent chez les souris WT et les souris HZ, la deuxième avec un couple d'amorces capable de mettre en évidence l'allèle de résistance à la néomycine qui perturbe le gène *Hyal-1*. Le gène de résistance à la néomycine doit être présent chez les souris HZ et les souris KO pour le gène *Hyal-1*.

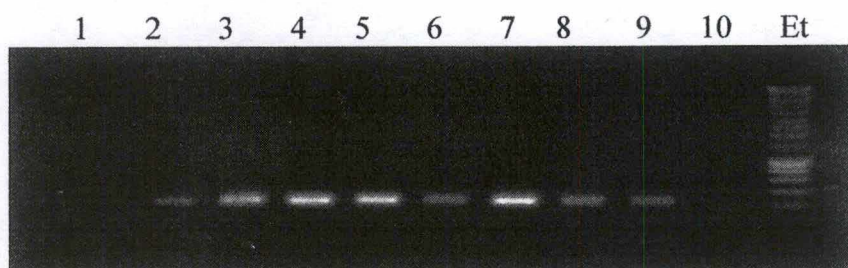
En vue de mettre au point cette technique, différents couples d'amorces et différentes températures d'hybridation ont été testés afin d'obtenir une résolution optimale. Les amorces finalement choisies pour l'amplification du gène *Hyal-1* sont sHyal1KO612 et sHyal1KO613 dont la température d'hybridation optimale est de 61°C. Le fragment résultant de l'amplification du gène *Hyal-1* comprend 340pb. Quant aux amorces sélectionnées pour l'amplification du gène de résistance à la néomycine, il s'agit de sHyal1KO610 et sHyal1KO611, dont la température d'hybridation optimale est de 52°C. Le fragment résultant de l'amplification de ce gène comprend 280pb.

##### Résultats et interprétations

Voici un exemple de résultat de génotypage de 8 souris issues de couples KO x KO et de couples KO x HZ de l'élevage. La **Figure 18** montre le résultat de l'amplification du gène *Hyal-1* chez ces 8 souris et la **Figure 19** indique l'amplification du gène de résistance à la néomycine.



**Figure 18 :** Résultat PCR du génotypage de 8 souris pour le gène *Hyal-1*. L'étalon (Et) correspond au marqueur de taille Smart Ladder dont les deux dernières bandes en partant du bas indiquent respectivement 200 et 400 pb. Les pistes 1 et 10 correspondent à des échantillons aqueux sans ADNc.



**Figure 19 :** Résultat PCR du génotypage de 8 souris pour le gène de résistance à la néomycine. L'étalon (Et) correspond au marqueur de taille Smart Ladder dont les deux bandes en partant du bas correspondent respectivement à 200 et 400 pb. Les pistes 1 et 10 correspondent à des échantillons aqueux sans ADNc

Sur base de l'image de ces deux PCR, nous pouvons observer que seul un animal (position 9) présente une amplification du gène *Hyal-1* mais que les 8 animaux (positions 2 à 9) présentent une amplification du gène de résistance à la néomycine. Nous pouvons conclure que l'animal en position 9 est HZ pour le gène *Hyal-1* tandis que les autres individus sont KO pour ce gène.

Cette technique nous permet donc de sélectionner les individus KO au sein de l'élevage, individus qui seront nécessaires à la réalisation des expériences ultérieures.

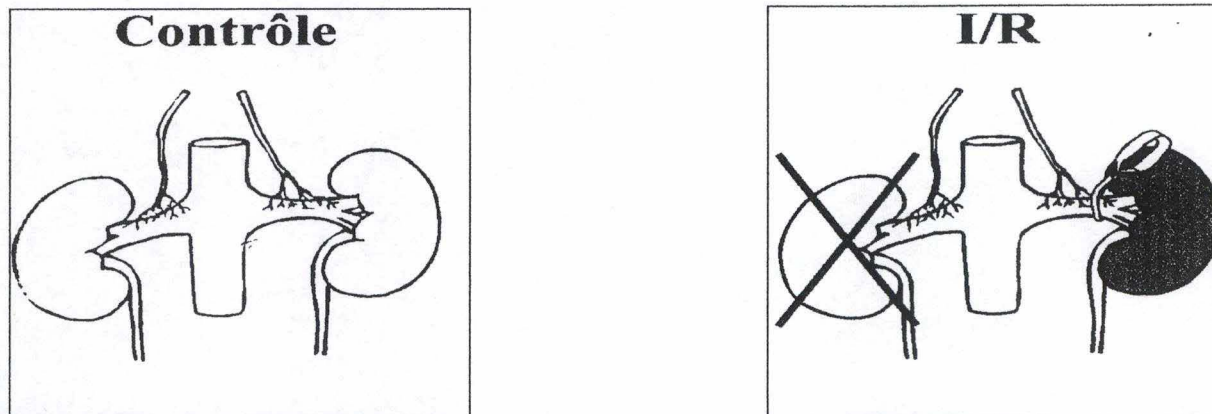
### Les groupes expérimentaux

Au cours de ce mémoire, différents groupes expérimentaux ont été réalisés.

Dans un premier temps, nous avons tout d'abord utilisé trois types de souris dont le génome n'exprime pas les mêmes hyaluronidases à savoir des souris WT, des souris KO pour l'enzyme *Hyal-1* et des KO pour l'enzyme *Hyal-2*. Ces différentes souches de souris sont élevées au sein du laboratoire.

Ensuite, en vue d'étudier l'évolution de l'expression génique et protéique d'*Hyal-1* faisant suite à une I/R, des souris WT ont été utilisées. Certaines de ces souris n'ont pas été ischémiées et ont servi de contrôle (CTL) ; d'autres ont subi une I/R du rein gauche de 30

minutes et une uninephrectomie droite (**Figure 20**). Le rein gauche a été prélevé 24 heures ou 7 jours après la reperfusion.



**Figure 20** : Cette figure représente 2 des groupes expérimentaux, les animaux non ischémiés (contrôle) et les animaux ischémiés (I/R) dont le rein gauche a été prélevé 24 heures ou 7 jours après l'I/R.

## **B. METHODE RELATIVE A L'ACTIVITE HYALURONIDASIQUE : LA ZYMOGRAPHIE**

### Introduction

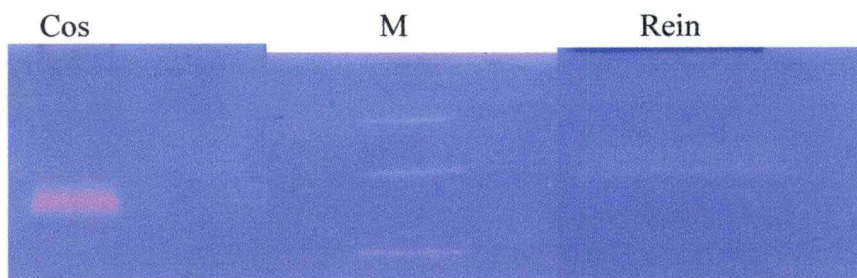
La technique de zymographie permet de visualiser l'activité enzymatique après électrophorèse en gel de polyacrylamide-HA. Elle ne peut mesurer qu'une activité de dégradation totale de l'HA qui ne laisse subsister que des résidus de PM inférieur à 1.5 kDa, les seuls qui ne soient pas détectés par le colorant Stains-All (Fischer-Szafarz et al., 1984). La révélation de l'activité se fait à un pH de 3,7 parce que des expériences préliminaires ont montré que ce pH acide est celui où l'activité hyaluronidasique maximale est décelée dans la majorité des tissus de l'organisme. Dans aucun organe excepté le testicule (spermatozoïdes), on ne découvre d'activité hyaluronidasique à un pH neutre.

Un des buts de ce mémoire était de vérifier si le profil d'activité hyaluronidasique rénale de la souris WT est semblable à celui du rat (deux bandes d'activité à environ 70 et 95kDa), et ensuite d'utiliser les souris KO pour *Hyal-1* et pour *Hyal-2* pour identifier par défaut les bandes d'activité hyaluronidasique correspondantes.

### Résultats et interprétations

- **Le rein entier**

La **Figure 21** illustre le résultat de la zymographie obtenu avec un gel de 12% d'acrylamide sur lequel on a déposé une quantité d'homogénat de rein entier d'un animal WT correspondant à 60 µg de protéines. L'homogénéisation du tissu rénal a été réalisée dans une solution de sucrose 0,25 M. Un extrait de cellules Cos sert de contrôle, car nous savons que ces cellules de singe possèdent une activité hyaluronidasique intense.



**Figure 21** : Electrophorèse dans un gel d'acrylamide 12% contenant de l'HA (=zymographie). Le puits « Cos » correspond à 10 µg d'un homogénat de cellules Cos servant de contrôle positif, le puits « Rein » correspond à 60 µg de protéines de rein d'un animal WT. La piste « M » correspond aux marqueurs de PM Prosieve ; ses différentes bandes correspondent respectivement en partant du haut à 119, 78 et 48 kDa.

Comme attendu, la piste « Cos » présente une activité hyaluronidasique intense centrée aux alentours de 60 kDa (calculé d'après le marqueur Prosieve). Dans le puits contenant l'échantillon de rein de souris, on distingue faiblement deux fines bandes d'activité hyaluronidasique proches l'une de l'autre, situées de part et d'autre du marqueur de 78 kDa, à environ 72 kDa d'une part et 90 kDa d'autre part. Ce profil est relativement semblable à celui d'un rein de rat.

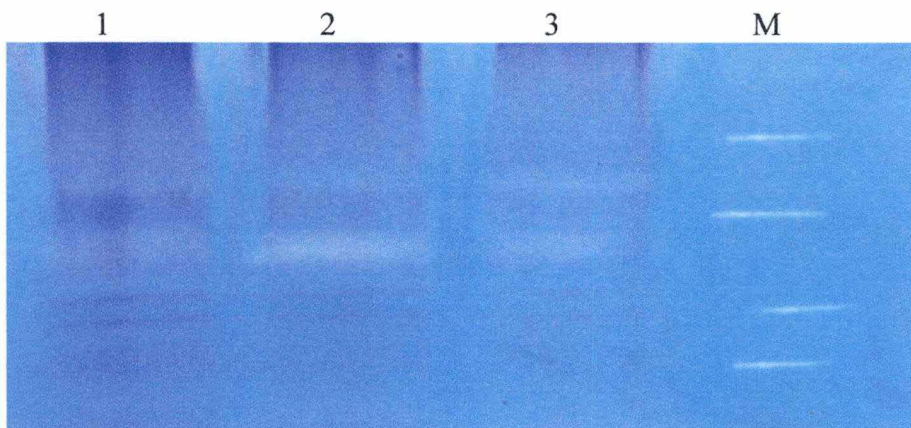
Le marqueur de PM Prosieve est un marqueur protéique coloré qui disparaît lorsque le gel est incubé en présence de Pronase ; c'est pourquoi, avant cette incubation, on réalise des marques dans le gel au niveau des différentes bandes observées après électrophorèse.

La littérature nous permet de poser l'hypothèse que seule Hyal-1, et pas Hyal-2, pourrait être responsable de la visualisation d'une activité hyaluronidasique. En effet, Hyal-1, mais pas Hyal-2, est capable de dégrader l'HA en fragments d'assez petite taille afin que ceux-ci ne soient pas colorés par le Stains-All. Lorsque l'on observe la zymographie, on constate que la ou les enzyme(s) rénale(s) responsable(s) de cette activité est (sont) détectée(s) entre 70 et 90 kDa. Ces PM sont plus élevés que celui de la bande d'activité des homogénats de cellules Cos (60 kDa), pour lesquels cette activité correspond probablement à Hyal-1 de singe. Il est possible que la ou les isoenzyme(s) Hyal-1 de souris et de singe ne présente(nt) pas les mêmes formes moléculaires finales, que d'autres hyaluronidasases soient impliquées dans le rein de souris (par exemple Hyal-3), et que le type d'homogénat (cellules *versus* tissus) influence la migration en zymographie. De plus, cette migration n'est pas nécessairement identique à celle qui serait observée sur un gel non imprégné d'HA, et une comparaison directe avec un western blot est donc délicate.

- **Les différentes parties du rein**

Après avoir pu mettre en évidence que le profil d'activité hyaluronidasique rénale était semblable pour le rein entier de souris WT et de rat, nous nous sommes intéressés au profil d'activité des différentes zones du rein, à savoir le cortex, l'OSOM et l'ISOM. Pour des raisons pratiques, l'activité hyaluronidasique au niveau de la médullaire interne du rein n'a pas été étudiée étant donné que la quantité de tissu de cette zone que l'on peut isoler chez une souris est très faible.

La **Figure 22** illustre les résultats obtenus avec un gel de 8% d'acrylamide sur lequel on a déposé 85 µg d'un homogénat de tissu de chaque zone du rein, tissu qui a été homogénéisé dans du sucrose 0,25 M.



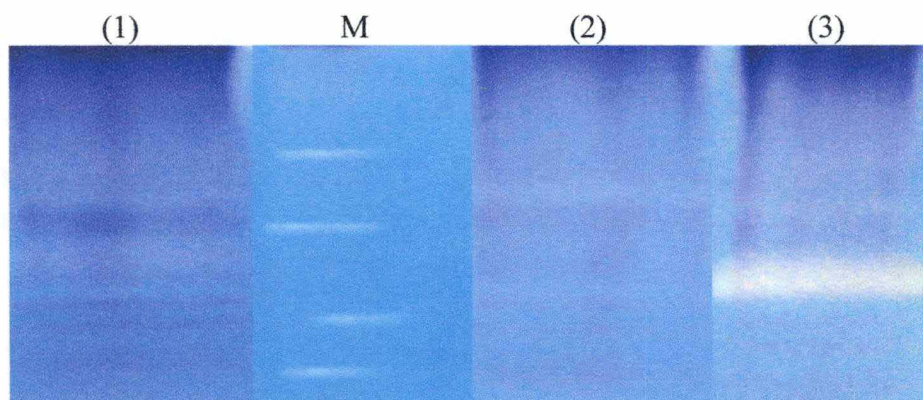
**Figure 22** : Electrophorèse dans un gel d'acrylamide 8% contenant de l'HA (=zymographie). Chaque piste du gel contient 85 µg de protéines de différents homogénats des différentes zones du rein de souris wt qui proviennent : 1, du cortex ; 2 de l'OSOM, 3, de l'ISOM. Le marqueur utilisé est le marqueur Prosieve dont les bandes correspondent respectivement en partant du haut à 119, 78, 48 et 38 kDa.

Au niveau de l'OSOM et de l'ISOM, nous pouvons également observer un profil d'activité hyaluronidasique sous forme de deux bandes, comme c'était le cas pour le rein entier. La coloration de ces bandes ne présente toutefois pas la couleur rose attendue. Sur cette figure nous pouvons mieux observer le PM des différentes enzymes responsables des bandes d'activité. L'enzyme responsable de la bande inférieure d'activité a un PM d'environ 65 kDa tandis que l'enzyme responsable de la bande supérieure d'activité a un PM d'environ 90 kDa. La bande de 65 kDa semble plus intense dans l'OSOM que dans les autres zones. L'activité du cortex n'est pas clairement discernable, bien que le profil blanchâtre paraisse semblable à celui des deux autres.

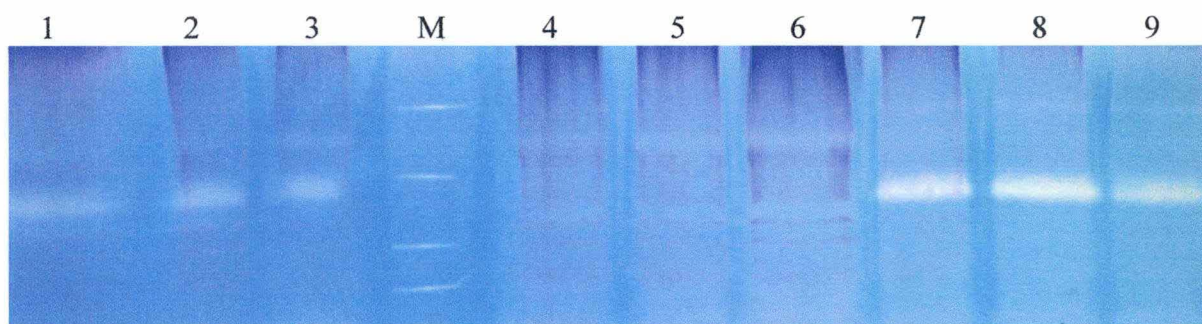
- **Les animaux KO Hyal-1 et KO Hyal-2**

L'utilisation des animaux KO *Hyal-1* et *Hyal-2* a eu pour but de déterminer quelle enzyme n'était plus exprimée chez le rat 24h après ischémie provoquant ainsi la disparition de la bande inférieure d'activité hyaluronidasique.

La **Figure 23** illustre la comparaison des profils d'activité hyaluronidasique au niveau du rein entier de souris WT, KO pour *Hyal-1* et KO pour *Hyal-2* tandis que la **Figure 24** illustre la comparaison des profils d'activité hyaluronidasique au niveau des différentes zones du rein (cortex, OSOM, ISOM) des mêmes souris.



**Figure 23:** Electrophorèse dans un gel d'acrylamide 8% contenant de l'HA (=zymographie). Chaque piste du gel contient 85 µg d'homogénats de rein entier de souris : 1, WT ; 2, KO *Hyal-1* ; 3, KO *Hyal-2*. Le marqueur de PM utilisé est le marqueur Prosieve et ses différentes bandes correspondent respectivement à en partant du haut à 119, 78, 48 et 38 kDa.



**Figure 24:** Electrophorèse dans un gel d'acrylamide 8% contenant de l'HA (=zymographie). Chaque piste du gel contient 85 µg de protéines de différents homogénats des différentes zones du rein de souris WT qui proviennent : 1, du cortex WT ; 2 de l'OSOM WT, 3, de l'ISOM WT, 4, du cortex KO *Hyal-1*, 5, de l'OSOM KO *hyal-1*, 6, de l'ISOM KO *Hyal-1*, 7, du cortex KO *Hyal-2*, 8, de l'OSOM KO *Hyal-2* et 9, de l'ISOM KO *Hyal-2*. Le marqueur utilisé est le marqueur Prosieve dont les bandes correspondent respectivement en partant du haut à 119, 78, 48 et 38 kDa.

Sur la **Figure 23** (rein total), l'activité du rein WT (piste 1) n'est pas clairement discernée ; il est donc difficile d'affirmer ce qu'il en est du tissu de l'animal KO *Hyal-1* (piste 2) où aucune activité n'est discernée non plus. En revanche, une bande très nette apparaît dans l'extrait du KO *Hyal-2* (piste 3). Cette bande, située à environ 57 kDa, semble localisée à un PM un peu plus bas que la bande inférieure distinguée dans le rein WT de la Figure 21, mais les comparaisons d'un gel à l'autre sont délicates.

Les résultats obtenus au départ des échantillons des différentes zones du rein (**Figure 24**) sont plus parlants. Ici, l'animal WT présente une bande d'activité nette à environ 65 kDa, tout comme les échantillons de souris KO *Hyal-2*. En revanche, aucune activité claire n'est décelée dans les 3 zones rénales des souris KO *Hyal-1*. On peut donc conclure avec une bonne confiance que la zone d'activité hyaluronidasique située à environ 65 kDa correspond bien à *Hyal-1*. Il s'agit vraisemblablement de la même activité enzymatique que celle qui a été mesurée comme « bande inférieure » dans le rein de rat et dans certains échantillons de souris (cf. **Figure 21**). Sur base des résultats obtenus, on ne peut pas se prononcer avec certitude sur l'existence d'une deuxième bande d'activité située à un PM plus élevé.

Une dernière observation est l'activité accrue de l'hyaluronidase de 65 kDa (vraisemblablement Hyal-1) dans les souris KO *Hyal-2* par rapport aux souris WT. Il se pourrait que l'absence d'*Hyal-2* entraîne, par une sorte de compensation, une activité Hyal-1 plus importante. Cela reste à confirmer par d'autres expériences.

Sur base des observations actuelles, nous pouvons également inférer que la bande d'activité hyaluronidasique de PM plus faible qui disparaît dans le rein du rat lorsque celui-ci est prélevé 24 heures après l'I/R correspond également à Hyal-1, et que celle-ci serait donc sous-exprimée à ce moment précis de la phase post-I/R.

### **C. WESTERN BLOT ET « TRUE BLOT »**

Au cours de ce travail, différents anticorps ont été testés afin de mettre la protéine Hyal-1 en évidence au niveau du rein entier et de ses différentes zones, par comparaison au rein d'un animal KO *Hyal-1* dans lequel aucun signal ne devait être détectable. Le but ultérieur de cette technique aurait également été d'étudier le profil d'expression d'Hyal-1 au niveau des différentes zones du rein (cortex, OSOM, ISOM) après I/R. Cependant, aucun de ces anticorps n'a permis d'obtenir un signal fiable et/ou reproductible malgré de multiples essais de western blot.

L'anticorps polyclonal anti-Hyal-1 produit chez le lapin (donné par le Dr.Frost de la firme Halozyme) n'a montré qu'un signal aspécifique. Cet anticorps avait été testé à une dilution 1/2000 sur différents échantillons contenant 25 µg de protéines, l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à une horseradish peroxidase étant utilisé à une concentration de 1/8000.

Un autre anticorps, nommé 1D10, monoclonal dressé chez la souris contre la forme humaine d'Hyal-1, a été utilisé avec une technique dite « en true blot » dans laquelle l'anticorps secondaire anti-souris ne reconnaît pas les immunoglobulines endogènes mais seulement l'anticorps primaire. L'anticorps 1D10 a été testé sur des échantillons de 5, 30 et 60 µg de protéines à une dilution de 1/2000 avec un anticorps secondaire « true blot » à une dilution de 1/2000. Cependant, malgré les différents essais réalisés, aucun signal spécifique pour la protéine Hyal-1 n'a jamais pu être observé dans le rein, alors que cette technique permet de détecter Hyal-1 de façon spécifique dans le foie de souris. Il est possible que l'expression d'Hyal-1 dans le rein soit insuffisante pour la technique de western blot utilisée avec les anticorps et dans les conditions testés durant ce mémoire.

### **D. LA RT-PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL**

#### **Introduction**

Le but de cette expérience a été de quantifier l'ARNm d'*Hyal-1* après une I/R rénale chez des souris WT. Pour ce faire, des reins contrôles (CTL) n'ayant pas subi d'ischémie ont été utilisés ainsi que des reins gauches de souris prélevés 24 heures et 7 jours après I/R. Tous les reins ont été homogénéisés et l'ARN en a été extrait avant d'être utilisé en RT-PCR pour générer l'ADNc puis pour doser l'expression de l'enzyme Hyal-1 dans chaque échantillon en PCR quantitative en temps réel à l'aide d'une machine AbiPrism 7500.

### Interprétations des résultats

L'ordinateur connecté à la machine Abi Prism 7500 fournit une série de résultats dont voici l'explication.

L'appareil mesure, via l'émission de fluorescence lorsque la sonde Taqman est clivée (voir Matériel et Méthodes), l'expression de deux gènes : le gène d'intérêt *Hyal-1* et un gène endogène exprimé de façon constante dans les différents échantillons. Dans ce cas-ci, c'est le gène de l'hypoxanthine phosphoribosyltransférase de souris (mhprt) qui a été choisi. Pour chaque échantillon, un seuil (« Ct » ou threshold) est calculé : il indique le cycle de la PCR à partir duquel on observe une augmentation significative de l'émission de la fluorescence de la sonde d'*Hyal-1*, ce qui correspond à l'expression de l'ARNm correspondant. Etant donné que chaque mesure est réalisée sous forme de triplicats, une moyenne des 3 valeurs de Ct est réalisée. Pour chaque échantillon on dose également l'expression moyenne du gène endogène (mhprt). La soustraction de la moyenne des Ct du gène de référence (mhprt) à celle des Ct d'*Hyal-1* permet de réaliser une première normalisation, qui aboutit à un « dCt » ou « delta Ct ». Celui-ci est ensuite divisé par le dCt d'un échantillon exprimant le gène cible que l'on choisit comme calibrateur. Ce calcul permet de réaliser une deuxième normalisation et d'obtenir un « ddCt ». Ces différentes normalisations permettent de corriger les fluctuations de fluorescence causées par des erreurs dans les concentrations ou les volumes déposés dans les puits au moment de l'expérience. La valeur de ddCt obtenue peut ensuite être transformée en valeur absolue via un exposant, soit  $2^{-ddCt}$ , qui est aussi appelée valeur « RQ » (quantification relative).

Les **Figures 25, 26 et 27** illustrent les différentes valeurs d'expression du gène *Hyal-1* obtenues pour les différents échantillons des différentes zones du rein (Cortex, OSOM, MI) prélevées à différents temps après l'I/R. Les dosages dans l'ISOM n'ont pas pu être réalisés pour des raisons techniques (trop grande variabilité dans l'expression du gène contrôle dans cette zone). Le temps imparti à ce mémoire n'ayant pas permis de résoudre immédiatement ce problème, nous avons préféré nous concentrer sur les zones où les dosages sont apparus d'une grande fiabilité, notamment par le caractère éminemment reproductible, à la fois du gène contrôle et du gène d'intérêt (cf. ci-dessous).

Evolution de l'expression du gène Hyal1 après ischémie dans le cortex rénal.

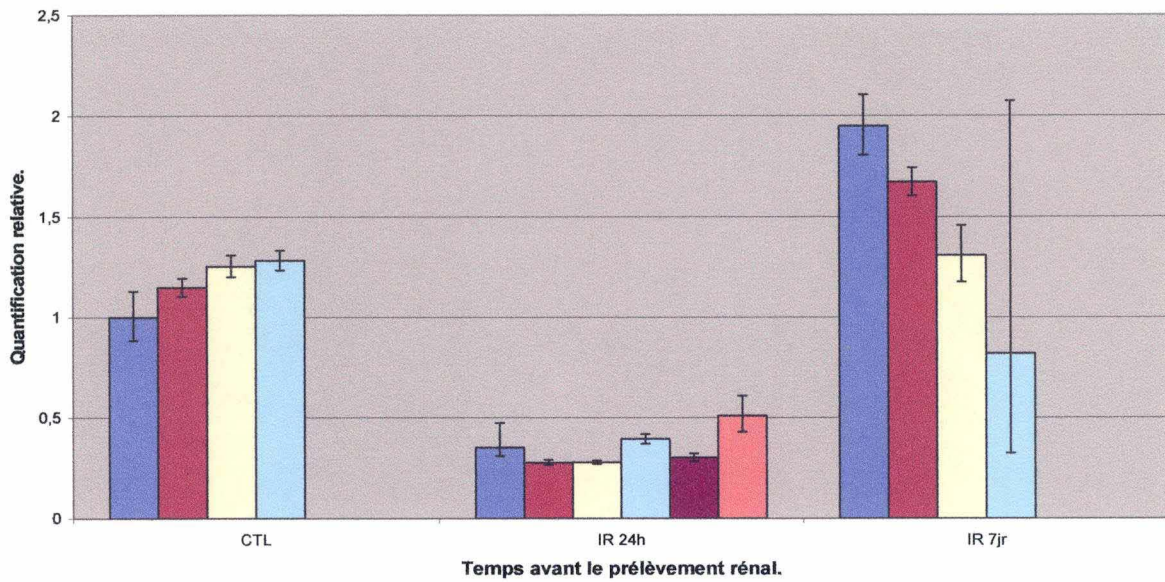


Figure 25 : Evolution de l'expression de l'enzyme Hyal1 du cortex rénal sans ischémie (CTL), 24h (IR 24h) ou 7 jours (IR 7jr) après I/R.

Evolution de l'expression du gène Hyal-1 après ischémie dans l'OSOM rénal.

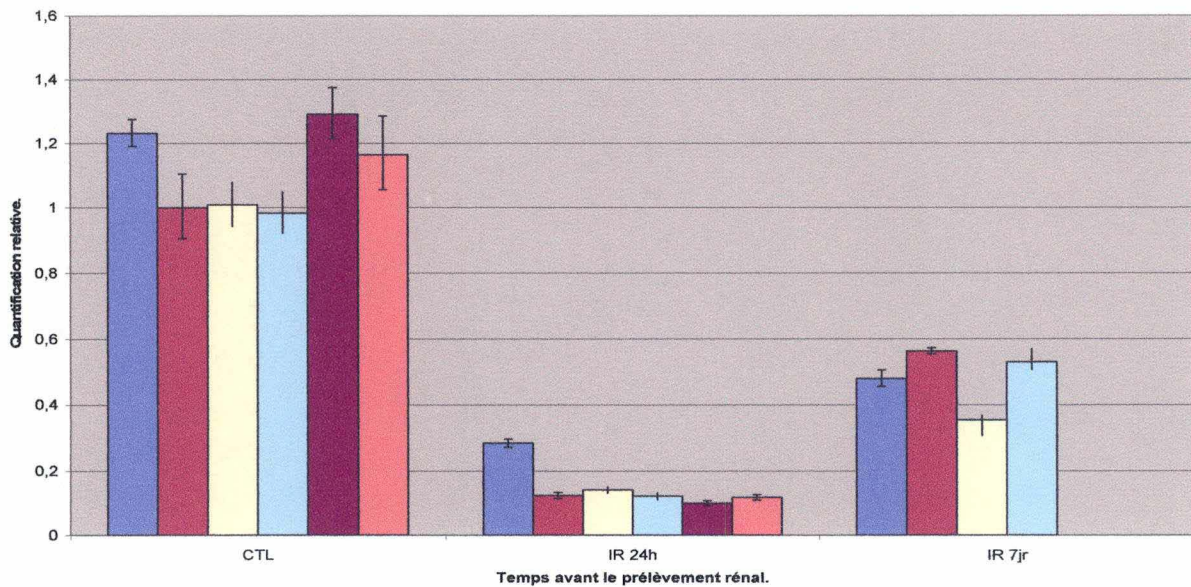
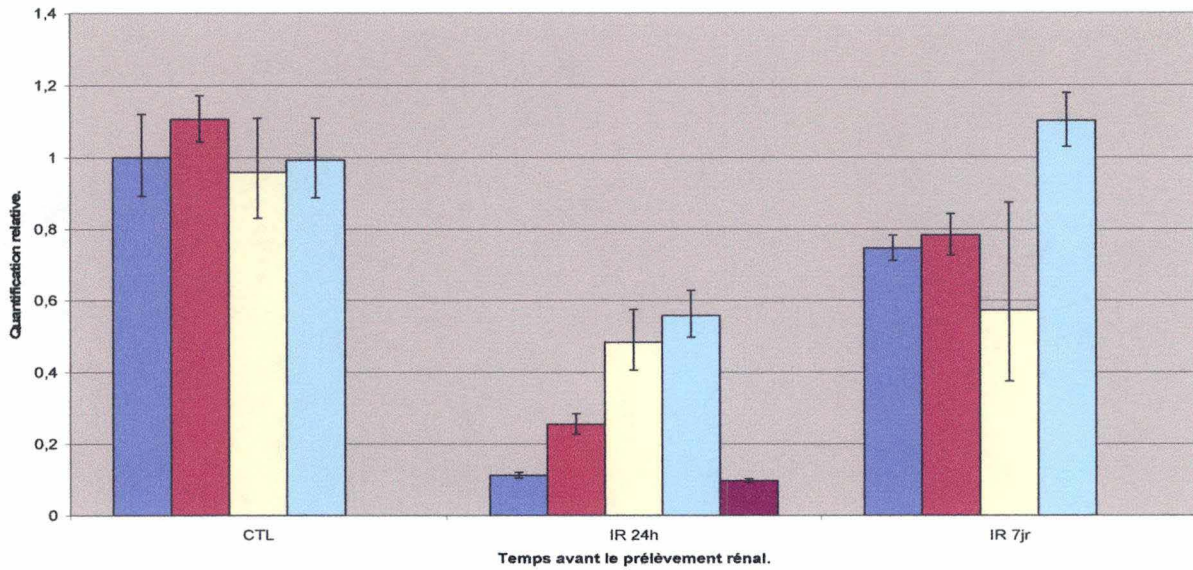


Figure 26 : Evolution de l'expression de l'enzyme Hyal1 de l'OSOM rénal sans ischémie (CTL), 24h (IR 24h) ou 7 jours (IR 7jr) après I/R.

Evolution de l'expression du gène Hyal1 après ischémie dans la médullaire interne rénale.

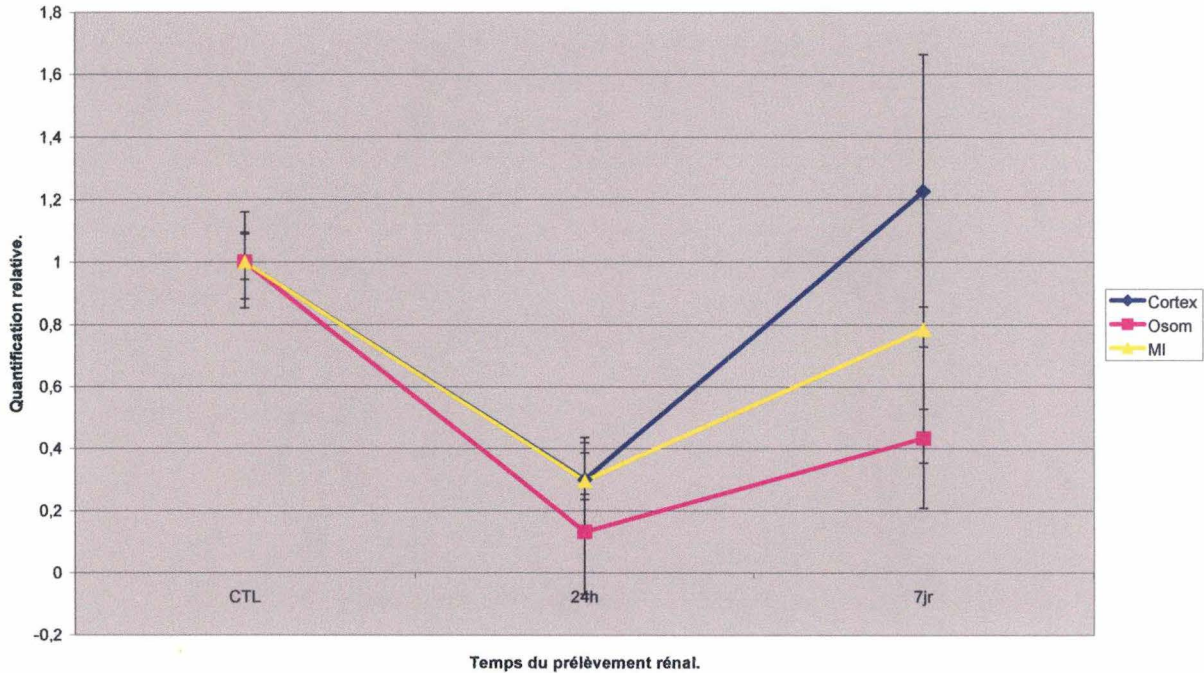


**Figure 27** : Evolution de l'expression de l'enzyme Hyal1 de la médullaire interne rénale sans ischémie (CTL), 24h (IR 24h) ou 7 jours (IR 7jr) après I/R.

Lorsque l'on observe les différents résultats d'un même groupe expérimental, à savoir les échantillons d'une même zone prélevés au même moment, on n'observe pas de grande variabilité entre ceux-ci. Les valeurs d'expression du gène restent relativement semblables au sein d'un même groupe expérimental.

Un graphe illustrant l'évolution de l'expression d'*Hyal-1* dans les différentes zones du rein sans ischémie (CTL), 24h (IR 24h) ou 7 jours (IR 7jr) après I/R a ensuite été réalisé en utilisant les moyennes des valeurs de quantification relative des différents échantillons et en amenant la moyenne des échantillons contrôle à 1 (**Figure 28**) Les barres d'erreurs indiquent les variabilités des différents échantillons d'un même groupe expérimental par rapport à cette moyenne.

Evolution de l'expression du gène Hyal-1 après ischémie dans les différentes zones du rein.



**Figure 29 :** Evolution de l'expression de l'enzyme Hyal-1 dans les différentes zones du rein sans ischémie (CTL), 24h (IR 24h) ou 7 jours (IR 7jr) après I/R en utilisant les moyennes des valeurs de quantification relative des différents échantillons.

Ce graphique permet d'observer pour chaque zone du rein une diminution de l'expression d'*Hyal-1* 24heures après I/R, qui est très semblable d'une zone à l'autre (diminution de 80 à 70%) et ensuite une réaugmentation du taux d'expression du gène 7 jours après I/R. Cette réaugmentation, cependant, est variable d'une zone à l'autre : l'expression d'*Hyal-1* se normalise, voire dépasse les valeurs initiales, dans le cortex, tandis qu'elle reste plus faible qu'au départ dans la médullaire interne, et surtout dans l'OSOM, où l'expression de l'enzyme 7 jours après I/R ne dépasse pas la moitié de la valeur initiale.

En résumé, l'inhibition de l'expression d'*Hyal-1* après I/R est systématique à travers tout le rein, et sa récupération est plus efficace dans le cortex que dans les zones plus profondes.

## **5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

L'objectif du mémoire était de participer à un projet de recherche qui s'intéresse aux mécanismes physiopathologiques de l'insuffisance rénale aiguë consécutive à une ischémie-reperfusion (I/R) et particulièrement au rôle de l'HA et de son métabolisme dans ces mécanismes. Le but de ce travail était de se concentrer sur l'expression d'une des enzymes de dégradation de l'HA, à savoir l'hyaluronidase Hyal-1, en bénéficiant des avantages de la transgénèse par l'utilisation d'animaux KO pour cette enzyme.

Ainsi, une première étape était de maîtriser la technique de vérification du génotype des souris de l'élevage de souris WT et KO pour le gène *Hyal-1* dont nous disposions au laboratoire. Ensuite, les études rénales ont pu être réalisées. Il fallait tout d'abord s'entraîner à réaliser les expériences d'I/R sur les animaux WT et prélever leur rein après 24 heures ou 7 jours. La réalisation de ce type d'expérience sur des souris n'est pas aisée et très peu de laboratoires l'utilisent « en routine » en Europe ou dans le monde. Nous avons établi différents groupes de comparaison : d'une part entre des souris C57bl/6 WT et des souris C57bl/6 KO pour le gène *Hyal-1*, et d'autre part entre des souris WT ischémisées dont le rein gauche était prélevé après 24 heures ou 7 jours et des souris WT non ischémisées. Le but de mon travail n'était toutefois pas de répéter les mesures déjà effectuées auparavant par d'autres chercheurs et étudiants dans le cadre de ce projet, à savoir l'évaluation histologique et fonctionnelle des conséquences de l'I/R rénale associée à une uninephrectomie chez la souris.

Je me suis concentrée sur l'enzyme Hyal-1. Celle-ci a été étudiée à différents niveaux : son activité enzymatique par zymographie, la présence de sa protéine par Western blot et enfin son expression génique par RT-PCR quantitative en temps réel. Ces deux dernières techniques ont été réalisées sur des animaux WT dans le cadre du modèle d'I/R rénale.

Suite à la réalisation de ces expériences, différentes conclusions peuvent être dressées.

### **PREPARATION DES GROUPES EXPERIMENTAUX**

La technique de génotypage a permis de mettre en évidence sans équivoque quelles souris étaient KO pour le gène *Hyal-1*, ce qui nous a permis de réaliser notre premier groupe expérimental, à savoir la comparaison des animaux WT et KO.

Afin de réaliser notre deuxième groupe expérimental comprenant les souris ischémisées, l'expérience d'I/R a dû être réalisée sur un grand nombre d'animaux WT. En effet, si les animaux survivaient généralement bien durant 24 heures, ce n'était pas nécessairement le cas 7 jours après avoir subi cette intervention. Nous avons dû faire face à un pic de mortalité 48 heures après la reperfusion rénale. Une telle mortalité avait déjà été observée auparavant dans notre laboratoire, mais dans une moindre mesure. Il est possible que des variations, même mineures, dans l'anesthésie, les manipulations ou le suivi des animaux soient responsables de cette différence.

## CARACTERISATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE RENALE

Comme énoncé précédemment, cette technique visait essentiellement à vérifier si le profil d'activité hyaluronidase de la souris WT était semblable à celui du rat. Les différentes expériences réalisées sur des échantillons de rein entier ou divisé en trois zones (cortex, OSOM et ISOM) ont permis de confirmer cette hypothèse en montrant chaque fois un profil zymographique sous forme de deux bandes d'activité hyaluronidase, chez la souris comme chez le rat. Les différentes expériences réalisées ne nous ont cependant pas permis de déclarer qu'une zone du rein exprimerait plus d'activité enzymatique qu'une autre. Il se pourrait que la situation diffère de celle du rat, pour lequel la littérature affirme que l'activité hyaluronidase est plus faible dans le cortex et qu'elle augmente significativement à mesure qu'on s'approche de la papille (Göransson et al., 2004). Selon toutes les données répertoriées dans la littérature, seule l'enzyme Hyal-1 (et éventuellement Hyal-3) peut être responsable d'une bande d'activité hyaluronidase car, contrairement à Hyal-2, elle peut dégrader l'HA en fragments de très petite taille qui dès lors ne sont plus colorés par le Stains-All. Aucune activité zymographique n'a pu, jusqu'à ce jour, être prouvée pour Hyal-2. Si plusieurs bandes d'activité sont présentes dans un tissu ou une culture cellulaire, il s'agit soit d'isozymes d'Hyal-1, soit d'Hyal-3, soit d'une autre forme d'hyaluronidase non répertoriée. Le gène *Spam-1* (hyaluronidase testiculaire de la souris, correspondant à *PH-20* chez l'homme) n'est exprimé que dans le spermatozoïde ou dans certaines tumeurs, mais pas dans le rein.

L'utilisation d'un animal KO pour l'enzyme Hyal-1 a permis de déterminer avec certitude laquelle ou lesquelles des deux bandes d'activité observées étaient dues à l'enzyme Hyal-1, étant donné que cette ou ces bande(s) devai(en)t disparaître dans l'animal KO. Selon le gel de zymographie, il semble que seule la bande inférieure du profil dépende de l'activité d'Hyal-1. Cette conclusion reste toutefois légèrement sujette à caution, et les expériences devraient idéalement être répétées.

Nous avons aussi réalisé la zymographie d'un extrait de rein d'un animal KO pour l'enzyme Hyal-2, ce qui a permis de vérifier que la bande inférieure d'activité hyaluronidase correspondant à Hyal-1 était non seulement bien présente mais aussi visiblement plus intense que chez une souris WT. On peut dès lors penser que l'absence d'Hyal-2 est « compensée » par une augmentation de l'activité de l'enzyme Hyal-1. Cependant, l'interprétation du profil d'activité hyaluronidase de l'animal KO pour *Hyal-2* doit se faire avec prudence car l'animal WT utilisé comme contrôle provient d'une souche C57bl/6, tout comme l'animal KO *Hyal-1*, mais l'animal KO *Hyal-2* ne provient pas de cette souche. Les résultats observés devront donc être confirmés au moyen des contrôles les plus adéquats.

## CARACTERISATION DE LA PROTEINE HYAL-1

Si les techniques de PCR et de zymographie ont permis de montrer clairement quels animaux exprimaient ou non le gène *Hyal-1*, il ne fut malheureusement pas possible de mettre la protéine en évidence chez les souris WT à l'aide d'anticorps et des techniques de western blot ou de true blot. La technique de true blot avait été précédemment mise au point dans le laboratoire et permettait de mettre la protéine Hyal-1 en évidence au niveau du foie de souris. Cependant, malgré les multiples essais réalisés à l'aide de différents anticorps, aucun signal spécifique n'a jamais pu être obtenu au niveau du rein de souris WT en « true blot » aussi bien qu'en western blot. Peut-être est-ce dû au fait que le rein contient moins d'Hyal-1 que le foie.

## CARACTERISATION DE L'EXPRESSION GENIQUE

Le but de l'expérience de PCR quantitative en temps réel a été d'observer l'évolution de l'expression génique d'*Hyal-1* en corrélation avec un modèle d'I/R rénale. Les résultats obtenus nous permettent d'observer que lorsque le rein gauche de la souris WT est prélevé 24 heures après I/R, l'expression d'*Hyal-1* est beaucoup plus faible que pour un animal contrôle. Lorsque le prélèvement rénal a lieu 7 jours après l'ischémie, c'est-à-dire lorsque le rein a eu le temps d'entamer sa régénération, l'expression du gène a augmenté par rapport au jour 1 sans toutefois atteindre le niveau d'expression d'un animal WT contrôle, sauf dans le cas du cortex.

Relevons que, dans notre laboratoire, la même expérience a été réalisée pour l'enzyme Hyal-2 et montre un profil d'expression génique au cours du temps semblable à celui d'*Hyal-1*, ce qui permet de suggérer que ces deux enzymes évoluent de concert, voire même collaborent, comme proposé dans le modèle de dégradation de l'HA de Stern et Csoka en 2004 (cf. Introduction).

L'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de ce mémoire chez la souris WT, à savoir l'évolution de l'expression génique d'*Hyal-1*, et les résultats obtenus par ailleurs avec Hyal-2, dans le modèle d'I/R, est semblable à celui des mêmes expériences réalisées dans notre laboratoire chez le rat, renforçant leur validité. Puisque les deux principales enzymes de dégradation tissulaires de l'HA diminuent dans toutes les zones du rein 24 heures après ischémie, on peut poser l'hypothèse d'une accumulation d'HA « intact » dans toutes ces zones. Chez le rat, Göransson et al. (2004) n'avaient décrit le phénomène d'accumulation d'HA post-ischémique que pour le cortex rénal mais des expériences précédentes de notre laboratoire ont étendu la constatation à l'ensemble du rein, sauf la papille (Declèves et al., 2006). Les conséquences d'une accumulation d'HA sont difficiles à prédire, car cette substance peut participer à la fois aux processus de réparation du rein et aux phénomènes inflammatoires, par exemple en facilitant la pénétration et le maintien des leucocytes et des macrophages qui expriment un récepteur à l'HA (récepteur CD44 ou RHAMM). A tout le moins, la diminution des hyaluronidases 24 heures après I/R suggère que l'HA qui s'accumule à ce moment reste intact, donc de haut poids moléculaire. Or, l'HA de haut poids moléculaire est moins susceptible d'entretenir des phénomènes inflammatoires (cf. Introduction), et pourrait donc bénéficier de préférence aux phénomènes régénératifs.

## LES PERSPECTIVES

En ce qui concerne la souris KO en Hyal-2, il serait nécessaire de recommencer l'expérience de zymographie avec un animal WT de même fond génétique afin de pouvoir interpréter le résultat avec certitude et affirmer que la bande d'activité hyaluronidasique d'*Hyal-1* surexprimée chez le KO *Hyal-2* est bien due à une compensation de l'absence de l'enzyme Hyal-2 et pas au fond génétique de l'animal. Il serait également intéressant d'étudier d'autres organes de l'animal KO *Hyal-2* afin d'observer s'ils présentent également un profil d'activité hyaluronidasique plus intense qui serait dû à une compensation de la dégradation de l'HA par l'enzyme Hyal-1.

Au niveau du métabolisme de l'HA, il serait aussi intéressant d'étudier les différentes HA-synthases ainsi que l'évolution de leur expression génique dans le cadre du modèle d'I/R rénale murin, également via la technique de PCR quantitative en temps réel, afin de mettre ces

données en corrélation avec l'évolution de l'expression des hyaluronidases rénales, en particulier dans l'interprétation de l'accumulation relative d'HA dans les différentes zones du rein.

On pourrait également envisager de trouver les conditions nécessaires aux différents anticorps utilisés en western blot afin de mettre en évidence la protéine Hyal-1. Cela dépend évidemment de la possibilité d'obtenir un anticorps efficace pour cette technique. Afin de mettre au point cette technique, la production de nouveaux anticorps s'avère donc sans doute nécessaire étant donné qu'aucun anticorps efficace n'est commercialement disponible. Notons que, dans nos expériences, la protéine n'a pas non plus été mise en évidence au niveau de cellules exprimant Hyal-1.

Dans le cadre du projet de recherche dans lequel s'inscrit ce mémoire, des expériences d'immunohistochimie visant à localiser l'HA et le CD44 ainsi que de mesurer les lésions et la prolifération cellulaire post-ischémie rénale ont été commencées sur des animaux KO pour l'enzyme Hyal-1. A première vue, les résultats des différents marquages réalisés ne montraient pas de différences significatives par rapport aux mêmes expériences réalisées lors d'un mémoire antérieur (Vasseur, 2005) sur des animaux WT (résultats préliminaires). Cependant, un travail de quantification plus précis devra être réalisé. En effet, on s'attendrait, si les conditions techniques sont correctes, à observer chez les animaux KO des zones où l'HA s'accumule. Le nombre d'individus utilisés pour l'expérience peut également être augmenté afin d'assurer la bonne reproductibilité des résultats. Dans l'hypothèse où on serait face à une maladie rare de surcharge lysosomale, il serait également intéressant de rechercher une éventuelle colocalisation de l'HA avec des lysosomes notamment à l'aide d'un marqueur lysosomal tel que Lamp-1 (lysosome associated protein). Cependant, la localisation intracellulaire d'HA pourrait être difficile à mettre en évidence en présence de gros dépôts extracellulaires.

Finalement, l'étude des autres hyaluronidases dont Hyal-2 ne doit pas être négligée car, à l'heure actuelle, différentes hypothèses sont toujours proposées pour expliquer la dégradation de l'HA. De nombreuses autres études sont également envisageables afin de comprendre les implications de l'HA dans le cadre de l'ischémie-reperfusion, par exemple sa dualité d'action vis-à-vis des phénomènes de régénération et d'inflammation. Ce mémoire consiste donc en une première étape pour la caractérisation du métabolisme de l'HA dans un modèle classique d'inflammation et d'ischémie.

## 6. BIBLIOGRAPHIE

- Al-Awqati, Q., Oliver, J.A. Stem cells in the kidney. *Kidney Int.* **61**: 387-395 (2002).
- Alejandro, V., Scandling Jr., J.D., Sibley, R.K., Dafoe, D., Alfrey, E., Deen, W. Mechanisms of filtration failure during postischemic injury of the human kidney. A study of the reperfused renal allograft. *J. Clin. Invest.* **95**: 820-831 (1995).
- Bai, K.J., Spicer, A.P., Mascarenhas, M.M., Yu, L., Ochoa, C.D., Garq, H.G., Quinn, D.A. The role of hyaluronan synthase 3 in ventilator induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* **172**:92-8 (2005).
- Basile, D.P., Donohoe, D., Roethe, K., Osborn, J.L. Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. *Am. J. Physiol.* **281**: F887-F899 (2001).
- Basireddy, M., Isbell, T.S., Tenq, X., Patel, R.P., Aqarwal, A. Effects of sodium nitrite on ischemia-reperfusion injury in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* (2006).
- Beck-Schimmer, B., Oertli, B., Pasch, T., Wuthrich, R.P. Hyaluronan induces monocyte chemoattractant protein-1 expression in renal tubular epithelial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **9**: 2283-2290 (1998).
- Bonegio, R., Lieberthal, W. Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **11**, 301-308 (2002).
- Bonventre, J.V. Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* **43** : 1160-1178 (1993).
- Bonventre, J.V., Weinberg, J.M. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J.Am. Soc. Nephrol* **14** , 2199-2210 (2003).
- Bonventre, J.V., Zuk, A. Ischemic acute renal failure : an inflammatory disease ? *Kidney Int.* **66**, 480-485 (2004).
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyeing. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254 (1976).
- Camenisch, T.D., Mc Donald, J.A. Hyaluronan is bigger better ? *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* , **23**, 431-433 (2000).
- Chatterjee, P.K., Todorovic, Z., Sivarajah, A., Mota-Filipe, H., Brown, P.A., Stewart, K.N., Cuzzocrea, S., Thiernemann, C. Differential effects of caspase inhibitors on the renal dysfunction and injury caused by ischemia-reperfusion of the rat kidney. *Eur J Pharmacol.* **503**:173-83 (2004).
- Cherr, G.N., Yudin and Overstreet, J.W. The dual functions of GPI-anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling. *Matrix biol.* **20**: 515, 525 (2001).

Chien, CT., Lee, PH, Chen, CF, Ma, MC., Lai, MK., Hsu, SM. De novo demonstration and co-localization of free-radical production and apoptosis formation in rat kidney subjected to ischaemia-reperfusion. *J.Am. Soc. Nephrol.* **12**: 973-82 (2001).

Conger, J., Robinette, J., Villar, A., Raij, L., Shultz, P. Increased nitric oxide synthase activity despite lack of response to endothelium-dependent vasodilators in postischemic acute renal failure in rats. *J Clin Invest.*, **96**:631-8 (1995).

Crespo-Santiago, D. The extracellular matrix of the central nervous system: chondroitin sulphate type proteoglycans and neural repair. *Rev. Neurol.* **38**: 843-851 (2004).

Csoka, A. B., Frost, G.I., Heng, H.H., Scherer, S.W., Mohapatra, G., Stern, R. The hyaluronidase gene HYAL1 maps to chromosome 3p21.2-p21.3 in human and 9F1-F2 in mouse, a conserved candidate tumor suppressor locus. *Genomics.* **48**:63-70 (1998).

Csoka, A.B., Scherer, S .W., Stern, R. Expression analysis of six paralogous human hyaluronidase genes clustered on chromosomes 3p21 and 7 q31. *Genomics* **60**: 356-61 (1999).

Csoka, A. B., Frost, G.I., Stern, R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix biol.* **20**, 499-508 (2001).

Day, A.J., Prestwich, G.D. Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant. *J Biol Chem.* **277**:4585-8 (2002).

DeAngelis, P.L. Hyaluronansynthase: fascinating glycosyltransferases from vertebrates, bacterial pathogens, and alga viruses. *Cell. Mol. Life Sci.* **56**: 670-682 (1999).

Declèves, A.E., Caron, N., Nonclerq, D., Legrand, A., Toubeau, G., Kramp, R., Flamion, B. Dynamics of hyaluronan, CD44 and inflammatory cells in the rat kidney after ischemia/reperfusion injury. *International journal of molecular medicine.* **18**, 83-94, 2006.

De Salegui, M., Pigman, W. The existence of an acid-active hyaluronidase in serum. *Arch. Biochem. Biophys.* **120**, 60-70 (1967).

Duran-Reynals, F. The effects of extracts of certain organs from normal and immunized animals on the infecting power of vaccine virus. *J. Exptl. Med.*, **50**, 327-340 (1929).

Fischer-Szafarz, B. Hyaluronidase polymorphism detected by polyacrylamide gel electrophoresis. Application to hyaluronidases from bacteria, slime molds, bee and snake venoms, bovine testes, rat liver lysosomes, and human serum. *Anal Biochem.* **143**, 76-81 (1984).

Fraser, J.R., Laurent, T.C., Laurent, U.B. Hyaluronan : its nature, functions and turnover. *J. Intern. Med.* **242**, 27-33 (1997).

Frost, G.I., Csoka, T.B., Wong, T., Stern, R. Purification, cloning, and expression of Human Plasma Hyaluronidase, *biochem. Biophys.* **236**, 10-15 (1997).

Ginetzinsky, A.G. Role of hyaluronidase in the re-absorption of water in renal tubules: the mechanism of action of the antidiuretic hormone. *Nature* **182**, 1218-1219 (1958).

Göransson, V., Johnsson, C., Jacobson, A., Heldin, P., Hällgren, R., Hansell, P. Renal hyaluronan accumulation and hyaluronan synthase expression after ischaemia-reperfusion injury in the rat. *Nephrol Dial Transplant*. **19**, 823-830 (2004).

Hansell, P., Maric, C., Alcorn, D., Göransson, V., Johnsson, C., Hällgren, R. Renomedullary interstitial cells regulate hyaluronan turnover depending on growth media osmolality suggesting a role in renal water handling. *Acta Physiol Scand.*, **165** : 115-6 (1999).

Hansell, P., Göransson, V., Odland, C., Gerdin, B., Hällgren, R. Hyaluronan content in the kidney in different states of body hydration. *Kidney Int* , **58**, 2061-2068 (2000).

Hascall, V.C., Laurent, T.C. Hyaluronan : structure and physical properties. *Science of hyalurona today* **257**:3827-32 (1997).

Heldin, P., Laurent, T.C., Heldin, C-H. Effect of growth factors on hyaluronan synthesis in cultured human fibroblasts. *Biochem J* ; **258**: 919-922 (1989).

Higuchi, Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.*, **66**: 1527-35 (2003).

Jackson, D.G. The lymphatics revisited: New perspectives from the hyaluronan receptor LYVE-1. *Trends. Cardiovasc.* **13**: 1-7 (2003).

Jones, S.G., Ito, T., Phillips, A.O. Regulation of proximal tubular epithelial cell CD44-mediated binding and internalisation of hyaluronan. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**: 1361-1377 (2003).

Kako, K., Kato, M., Matsuoka, T., Mustapha, A. Depression of membrane-bound Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase activity induced by free radicals and by ischemia of kidney. *Am. J. Physiol.* **254**: C330-C337 (1988).

Kale, S., et al. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. *J. Clin. Invest.* **112**:42-49 (2003).

Kieran, N.E., Doran, P.P., Connolly, S.B., Greenan, M.C., Higgins, D.F., Leonard, M., Godson, C., Taylor, C.T., Henger, A., Kretzler, M., Burne, M.J., Rabb, H., Brady, H.R. Modification of the transcriptomic response to renal ischemia/reperfusion injury by lipoxin analog. *Kidney Int.*, **64**:480-92 (2003).

Kim, E., Baba, D., Kimura, M., Yamashita, M., Kashiwabara, S., Baba, T. Identification of a hyaluronidase, Hyal 5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 18028-33 (2005).

Knudson, W., Biswas, C., Toole, B.P., Interactions between human tumor cells and fibroblasts stimulate hyaluronate synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**: 6767-6771 (1984).

Kreil, G. Hyaluronidases--a group of neglected enzymes. *Protein Sci* **4**, 1666-9 (1995).

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685 (1970).

Laurent, G., Yernaux, V., Nonclercq, D., Toubeau, G., Maldague, P., Tulkens, P.M., Heuson-Stiennon, J.A. Tissue injury and proliferative response induced in rat kidney by cisdiamminedichloroplatinium(II). *Virchows Arch. B. Cell. Pathol. Incl. Mol. Pathol.* **55**, 129-145 (1988).

Laurent, T.C., Fraser, J. R.E. Hyaluronan. *The FASEB journal* ; **6** (1992).

Laurent, T.C., Laurent, U.B., Fraser, J. R.E. The structure and function of hyaluronan : an overview. *Immunol. Cell Biol.* **74** : A1-A7 (1996).

Lee, T.H., Wisniexski, H.G., Vilcek. A novel secretory tumor necrosis factor-inducible protein (TSG-6) is a member of the family of hyaluronate binding proteins, closely related to the adhesion receptor CD44. *J. Cell Biol.* **116**: 545-557 (1992).

Lee, J.Y., Spicer, A.P. Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr Opin Cell Biol.*, **12** :581-6 (2000).

Lepperdinger, G., Strobl, B., Kreil, G. Hyal2, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity. *J. Biol Chem.* **273**: 22466-70 (1998).

Lewington, A.J.P., Padanilam, B.J., Martin, D.R., Hammerman, M.R. Expression of CD44 in kidney after acute ischemic injury in rats. *Am J Physiol.* **278**, R247-R254 (2000).

Lieberthal, W., Nigam, SK. Acute renal failure. I. Relative importance of proximal vs. distal tubular injury. *Am. J. Physiol.* **275**: F623-F631 (1998).

Lokeshwar, V.B., Schroeder, G.L., Carey, R.I., Soloway, M.S., Iida, N. Regulation of hyaluronidase activity by alternative mRNA splicing. *J Biol Chem.* **277**, 33654-63 (2002).

Lorfèvre, F. Caractérisation de la régénération dans un modèle expérimental de néphrotoxicité chronique chez le rat. *Mémoire de Licence, Faculté des sciences* **1 vol.**: 71p (2004).

Martin-DeLeon, P.A. Epididymial SPAM1 and its impact on sperm function. *Molecular and cellular endocrinology* **250**: 114-121 (2006).

Matthys, E., Patton, M.K., Osgood, R.W., Venkatachalam, M.A., Stein J.H. Alterations in vascular function and morphology in acute ischemic renal failure. *Kidney Int.*, **23**:717-24 (1983).

Meyer, K., Palmer, J.W. The polysaccharide of the vitreous humour. *J. Biol. Chem.* **107**, 629-634 (1934).

Meyer, K. The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase. *Physiol Rev* **27**, 335-359 (1947).

Molitoris, B.A., Maris, J. The role of cell adhesion molecules in ischemic acute renal failure. *Am. J. Med.* **106**: 583-592 (1999).

Nandi, A., Estess, P., Siegelman, M.H. Hyaluronan anchoring and regulation on the surface of vascular endothelial cells is mediated through the functionally active form of CD44. *J. Biol. Chem.* **275** : 14939-14948 (2000).

Natowicz, M.R., Short, M.P., Wang, Y., Dickersin, G.R., Gebhardt, M.C., Rosenthal, D.I., Sims, K.B., Rosenberg, A.E. Clinical and biochemical manifestations of hyaluronidase deficiency. *N. Engl. J. Med.* **335** , 1029-1033 (1996).

Neame, P.J., Barry, F.P. The link proteins. *Exs.* **70**: 53-72 (1994).

Nonclercq, D., Wrona, S., Toubeau, G., Zanen, J., Heuson-Stiennon J.A., Shaudies, R.P., Laurent, G. Tubular injury and regeneration in rat kidney following acute exposure to gentamycin : a time course study. *Ren. Fail.* **14**, 507-521 (1992).

Novak, U., Stylli, S. S., Kaye, A. H., Lepperdinger, G. Hyaluronidase-2 overexpression accelerates intracerebral but not subcutaneous tumor formation of murine astrocytoma cells. *Cancer Res* **59**, 6246-50 (1999).

Oken, D.E., Hemodynamic basis for human acute renal failure. *Am. J. Med.* **76**: 702-710 (1984).

Oliver, J.A., Maarouf, O., Cheema, F.H., Martens, T.P., Al-Awqati, Q. The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *The Journal of Clinical Investigation* **114**, 795-804 (2004).

Paller MS. The cell biology of reperfusion injury in the kidney, *J. Investig Med.* **42** : 632-639 (1994).

Pasonen-Seppanen, S., Karvinen, S., Torronen, K., Hyttinen, J.M., Jokela, T., Lammi, M.J., Tammi, M.I., Tammi, R. EGF upregulates, whereas TGF-beta downregulates, the hyaluronan synthases HAS2 and HAS3 in organotypic keratinocyte cultures: correlations with epidermal proliferation and differentiation. *J. Invest. Dermatol.* **120**: 1038-1044 (2003).

Pedagogos, E., Hewitson, T., Nicholls, K., Becker, G.J. Hyaluronan in rat renal fibroblasts : *in vitro* studies. *Nephron* ; **88**, 347-353 (2001).

Pitts, R.F. Physiologie du rein et du milieu intérieur. *1 vol., deuxième édition, Masson, Paris* (1976).

Primakoff, P., Hyatt, H., Myles, D.G. A role for the migrating sperm surface antigen PH-20 in guinea pig sperm binding to the egg zona pellucida. *J. Cell. Biol.* **101**, 2239-44 (1985).

Rabb, H., O'Meara, Y.M., Maderna, P., Coleman, P., Brady, H.R. Leukocytes, cell adhesion molecules and ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* **51** : 1463-1468 (1997).

Rai, S.K., Duh, F-M., Vigdorovich, V., Danilkovitch-Miagkova, A., Lerman, M.I., Miller, D. Candidate tumor suppressor HYAL2 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell-

surface receptor for jaagsiekte sheep retrovirus, the envelope protein of which mediates oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 4443-8 (2001).

Rockey, D.C., Chung, J.J., McKee, C.M., Noble, P.W. Stimulation of inducible nitric oxide synthase in rat liver by hyaluronan fragments. *Hepatology* **27** : 86-92 (1998).

Sibalic, V., Fan, X., Loffing, J., Wuthrich, R.P. Upregulated renal tubular CD44, hyaluronan and osteopontin in kdkd mice with interstitial nephritis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **12**: 1344-1353 (1997).

Slevin, M., Kumar, S., Gaffney, J. Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signalling pathways affecting vascular endothelial cell mitogenic and wound healing responses. *J. Biol. Chem.* **277**: 41046-41059 (2002).

Soullier, S., Gayraud, N., Méjean, C., Swarcz, I., Mourad, G., Argilés, A. Molecular mechanisms involved in kidney ischemia-reperfusion. *Nephrologie et thérapeutique* 315-321 (2005).

Spicer, A.P., McDonald, J.A.. Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family. *J Biol Chem* ; **273**, 1923-1932 (1998).

Stern, R., Csoka, A.B. Mammalian hyaluronidases (2000).  
<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/>

Stern, R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism : are we yet ? *Glycobiology* **13**, 105-115 (2003).

Stern, R. Update on the mammalian hyaluronidase . *Eur. J. Cell Biol.* **83**, 317-325 (2004).

Stern, R., Csoka, A.B. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *Eur J Cell Biol* **83**, 317-325 (2004).

Sung, F.L., Zhu, T.Y., AU-Yeung, K.K, Siow, Y.L. Enhanced MCP-1 expression during ischemia-reperfusion injury is mediated by oxidative stress and NF-kappaB. *Kidney Int.* **62**: 1160-70 (2002).

Takada, M., Nadeau, K.C., Shaw, G.D., Tilney, N.L. Prevention of late renal changes after initial ischemia/reperfusion injury by blocking early selectin binding. *Transplant.* **64** : 1520-1525 (1997).

Termeer, C.C., Sleeman, J.P., Simon, J.C. Hyaluronan-magic glue for the regulation of the immune response. *TRENDS in immunology* **24** : 112-114 (2003).

Toole, B.P. Hyaluronan in morphogenesis. *J. Intern. Med.* **242** :35-40 (1997).

Toole, B.P. Hyaluronan promotes the malignant phenotype. *Glycobiology* **12**, 37R-42R (2002).

Toole, B.P. Hyaluronan : from extracellular glue to pericellular cue. *Nature* **4** : 528-539 (2004).

Triggs-Raine, B., Salo, T.J., Zhang, H., Wicklow, B.A., Natowicz, M.R. Mutations in HYAL1, a member of a tandemly distributed multigene family encoding disparate hyaluronidase activities, cause a newly described lysosomal disorder, mucopolysaccharidosis IX. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **96**:6296-300 (1999).

Uchiyama, H., Dobashi, Y., Ohkouchi, K., Nagasawa, K. Chemical change involved in the oxidative reductive depolymerization of hyaluronic acid. *J. Biol. Chem.* **265** : 7753-9 (1990).

Udabage, L., Brownlee, G.R., Nilsson, S.K., Brown, T.J. The over-expression of HAS2, Hyal-2 and CD44 is implicated in the invasiveness of breast cancer. *Exp Cell Res* **310**, 205-17 (2005).

Vasseur, M., Localisation et expression de l'hyaluronane et du CD44 dans un modèle d'ischémie-reperfusion rénale chez la souris : parallélisme avec l'évolution des lésions, de la régénération et des processus fibrotiques., *Mémoire de licence en sciences biologiques UMH* (2005).

Verstrepen, W.A., Nouwen, E.J., Yue, X.S., De Broe, M.E. Altered growth factor expression during toxic proximal tubular necrosis and regeneration. *Kidney Int.* **43** : 1267-1279 (1993).

Weigel, P.H., Hascall, V.C., Tammi, M. Hyaluronan synthases. *J. Biol Chem.* **272** : 13997-14000 (1997).

Weigel, J.A., Raymond, R.C., Weigel, P.H. The hyaluronan receptor for endocytosis (HARE) is not CD44 or CD54 (ICAM-1) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **24** : 18-22 (2002).

Weitberg, A.B., Weitzman, S.A., Clark, E.P., Stossel, T.P. Effect of antioxidant-induced sister chromatid exchange formation. *J. Clin. Invest.* **75** : 1835-1841 (1985).

Welbourn, C.R., Goldman, G., Paterson, I.S., Valeri, C.R., Shepro, D., Hechtman, H.B. Pathophysiology is ischemia reperfusion injury : central role of the neutrophil. *Br J. Surg.* **78** : 651-655 (1991).

Wells, A.F., Larsson, E., Tengblad, A., Fellstrom, B., Tufveson, G., Klaresko, L., Laurent, T.C. The localization of hyaluronan in normal and rejected human kidneys. *Transplantation* **50** : 240-243 (1990).

Wells, A.F., Larsson, E., Hanas, E., Laurent, T., Hallgren, R., Tufveson, G. Increased hyaluronan in acutely rejecting human kidney grafts. *Transplantation* **55** : 1346-1349 (1993).

Witzgall, R., Brown, D., Schwarz, C., Bonventre, J.V. Localization of proliferating cell nuclear antigen vimentin c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogenous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. *J Clin Invest.* **93**: 2175-88 (1994).

Ysebaert, D.K., De Greef, K.E., Vercauteren, S.R., Ghielli, M., Verpooten, G.A., Eyskens, E.J., De Broe, M.E. Identification and kinetics of leukocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury. *Nephrol. Dial. Transplant.* **15** : 1526-1574 (2000).