

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### L'hyaluronane et son récepteur CD44 dans le rein de rats obèses

Boonen, Marielle

*Award date:*  
2003

[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.



---

FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX

NAMUR

**Faculté des Sciences**

**L'HYALURONANE ET SON RECEPTEUR CD44 DANS LE REIN  
DE RATS OBESES**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
licencié en Sciences biologiques**  
Marielle BOONEN  
Juin 2003

## **L'hyaluronane et son récepteur CD44 dans le rein de rats obèses**

BOONEN Marielle

### Résumé

L'hyaluronane est un polysaccharide anionique de haut poids moléculaire qui entre dans la composition des matrices extracellulaires et participe à divers processus physiologiques tels que le homing des lymphocytes, la concentration des urines, l'homéostasie de l'eau, etc. Il a aussi été envisagé un rôle de cette molécule dans des processus pathologiques tels que la progression tumorale et l'obésité. L'obésité est un problème de santé très important dans nos sociétés dont l'une des conséquences principales est le développement d'une hypertension. Néanmoins, les mécanismes par lesquels l'obésité augmente la pression artérielle n'ont pas encore été clairement élucidés. Une des hypothèses actuelles postule que des changements structurels et fonctionnels surviennent dans le rein des individus obèses, et que l'hyaluronane s'accumule dans les espaces interstitiels, provoquant la compression des tubules grêles et des vasa recta de la médullaire, et entraînant ainsi une rétention de sodium et une hypertension. Le travail réalisé a pour but de mettre au point un modèle d'obésité chez le rat, d'en suivre les conséquences sur la pression artérielle et d'étudier les distributions rénales de l'hyaluronane et de son récepteur CD44. Le modèle d'obésité chez le rat fut mis au point en utilisant un régime de type « cafétéria » à base d'aliments tels que du jambon, du fromage, des gâteaux, etc., et en contrôlant les apports hydriques. L'hyaluronane et le CD44 ont été marqués par immunohistochimie dans le rein de ces animaux, mais peu de différences entre les groupes furent observées. Seuls les animaux soumis à un régime gras et fort hydratés pendant 3 semaines présentèrent un changement de localisation de l'hyaluronane au sein des faisceaux vasculaires de la médullaire externe. Des dosages de l'hyaluronane réalisés sur des extraits tissulaires permirent de démontrer que les animaux bien hydratés ont plus d'hyaluronane dans la médullaire interne que les rats limités en eau. Enfin, au cours de ce travail, une technique de dosage de l'hyaluronane a été mise au point.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 2003

**Promoteur** : Flamion, B.

*Le travail réalisé dans le cadre ce mémoire a pu être mené à bien grâce au soutien et au temps que m'ont accordés certaines personnes.*

*En premier lieu, je tiens à remercier Mr Flamion de m'avoir suivie, dirigée et aidée tout au long de ce projet.*

*Je remercie ensuite le Révérend Père Piront, Thierry Arnould, Jaqueline Thirion et Gérard Trausch d'avoir accepté de lire ce travail.*

*Mes remerciements se tournent ensuite vers Mme Mertens qui par ses précieux conseils m'a permis de progresser pas à pas dans ce mémoire. Je remercie aussi Cécile, Marie et Kris pour leur gentillesse et la bonne humeur qu'elles m'ont communiquées tout au long de ces quelques mois. Merci à Mme Lacremans pour son aide précieuse, à Mr Dehousse pour le temps qu'il m'a accordé, et à Mme Daelman pour ses coups de mains avisés.*

*Je tiens ensuite à remercier Mr Toubeau de m'avoir accueilli au sein de son Laboratoire d'Histologie, et d'avoir passé du temps à me diriger, ainsi qu'à me conseiller.*

*Merci à Mr Kramp de m'avoir permis de réaliser une partie très importante de ce travail dans son Laboratoire de Physiologie. Je remercie bien sûr Nathalie Caron, Emma Jolie et Rachid Seqqat des heures qu'ils m'ont accordées afin de m'aider à mener ce projet à bien. Je remercie aussi Françoise Coulon pour l'immense travail qu'elle a réalisé afin de m'aider à avancer rapidement dans mon mémoire.*

*Je remercie la firme SpaDel pour son soutien.*

*Et enfin, un merci tout particulier pour mes parents qui m'ont permis de faire des études et qui m'ont soutenue tout au long de ces quatre années. Merci papa pour les restos « remonte moral », merci maman pour tes précieuses corrections, et merci soeurettes d'être là.*

## Liste des abréviations

ABC	Avidine Biotine Complex
DAB	DiAminoBenzidine
ESM	Ecart Sur la Moyenne
GH	rats soumis à un régime Gras et bien Hydratés
GL	rats soumis à un régime Gras et Limités en eau
GTL	rats soumis à un régime Gras et Très Limités en eau
HA	Hyaluronane ou Acide Hyaluronique
HABP	Hyaluronan-Binding Protein (protéine de liaison de l'hyaluronane)
HABPI*	HABP marquée à l'Iode radioactif
Hct	Hématocrite
ISOM	Inner Stripe of Outer Medulla (couche interne de la médullaire externe)
ME	Médullaire Externe
MI	Médullaire Interne
NH	rats soumis à un régime Normal et bien Hydratés
NL	rats soumis à un régime Normal et Limités en eau
NTL	rats soumis à un régime Normal et Très Limités en eau
OSOM	Outer Stripe of Outer Medulla (couche externe de la médullaire externe)
PAM	Pression Artérielle Moyenne
PBS	Phosphate Buffer Saline
PVDF	PolyVinylidène DiFluoride
rpm	round /min (tours par minutes)
Sépharose-HA	molécules d'hyaluronane fixées sur une résine de Sépharose
TSA	Tyramine Signal Amplification
U/C	rapport Urée / Créatinine

# Table des matières

<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>- 7 -</b>
<b>1.1. L'ACIDE HYALURONIQUE OU HYALURONANE</b>	<b>- 7 -</b>
1.1.1. STRUCTURE	- 7 -
1.1.2. LOCALISATION ET FONCTIONS	- 9 -
1.1.3. SYNTHÈSE ET DÉGRADATION DE L'HYALURONANE	- 9 -
<b>1.2. L'HYALURONANE DANS LE REIN</b>	<b>- 10 -</b>
1.2.1. QUELQUES ASPECTS IMPORTANTS DU REIN	- 10 -
1.2.2. L'INTERSTITIUM RENAL	- 12 -
1.2.3. LOCALISATION DE L'HYALURONANE DANS LE REIN	- 15 -
1.2.4. RÔLES DE L'HYALURONANE DANS LE REIN	- 15 -
1.2.5. ACCUMULATION RENALE D'HYALURONANE EN CONDITIONS PATHOLOGIQUES	- 16 -
1.2.6. LES PROTÉINES LIANT L'HYALURONANE	- 16 -
<b>1.3. LE RÉCEPTEUR À L'HYALURONANE CD44</b>	<b>- 17 -</b>
1.3.1. DÉCOUVERTE ET LOCALISATION	- 17 -
1.3.2. STRUCTURE	- 17 -
1.3.3. LE CD44 EN TANT QUE RÉCEPTEUR À L'HYALURONANE	- 18 -
1.3.4. RÔLE DU CD44 DANS LA DÉGRADATION DE L'HYALURONANE	- 20 -
1.3.5. AUTRES ROLES DU CD44	- 20 -
1.3.6. LOCALISATION DU CD44 DANS LE REIN	- 21 -
<b>1.4. L'HYPERTENSION LIÉE À L'OBÉSITÉ</b>	<b>- 21 -</b>
1.4.1. EPIDÉMIOLOGIE	- 21 -
1.4.2. HYPOTHÈSES ÉTIOLOGIQUES	- 22 -
1.4.3. RÔLES DES CHANGEMENTS STRUCTURELS ET FONCTIONNELS DANS LE REIN	- 23 -
1.4.4. MODELE D'OBESITE CHEZ LE RAT	- 25 -
<b>1.5. BUTS DU TRAVAIL</b>	<b>- 26 -</b>
<b>2. MATERIEL ET METHODES</b>	<b>- 26 -</b>
<b>2.1. PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES</b>	<b>- 27 -</b>
2.1.1. MESURE DE LA PRESSION ARTÉRIELLE MOYENNE (PAM)	- 27 -
2.1.2. PRÉLÈVEMENT DES REINS ET DU SANG	- 27 -
2.1.3. MESURE DE L'HÉMATOCRITE (HCT)	- 27 -
2.1.4. URÉE PLASMATIQUE	- 28 -
2.1.5. CRÉATININE PLASMATIQUE	- 28 -
2.1.6. OSMOLALITE PLASMATIQUE	- 28 -
2.1.7. SODIUM ET POTASSIUM URINAIRES	- 28 -
<b>2.2. MARQUAGES IMMUNOHISTOCHIMIQUES</b>	<b>- 29 -</b>
2.2.1. MARQUAGE IMMUNOHISTOCHIMIQUE DU RÉCEPTEUR CD44 DANS LE REIN DE RAT	- 29 -
2.2.2. DÉTECTION IMMUNOHISTOCHIMIQUE DE L'HYALURONANE DANS LE REIN DE RAT	- 32 -
2.2.3. EVALUATION DE L'INTENSITÉ DU MARQUAGE	- 34 -

<b>2.3. TECHNIQUES RELATIVES AUX PROTÉINES</b>	<b>- 34 -</b>
2.3.1. DOSAGE DES PROTEINES	- 34 -
2.3.2. ANALYSE DES PROTEINES PAR WESTERN BLOT	- 34 -
<b>2.4. TECHNIQUES RELATIVES À L'HYALURONANE</b>	<b>- 35 -</b>
2.4.1. DOSAGE DE L'ACIDE URONIQUE	- 35 -
2.4.2. DOSAGE DE L'HYALURONANE	- 35 -
2.4.3. MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE DOSAGE DE L'HYALURONANE	- 36 -
• PURIFICATION DES HABP	- 36 -
• IODINATION DES HABP	- 38 -
<b>2.5. MÉTHODES STATISTIQUES</b>	<b>- 38 -</b>
<b><u>3. RÉSULTATS</u></b>	<b><u>- 39 -</u></b>
<b>3.1. MISE AU POINT D'UN MODÈLE D'OBÉSITÉ CHEZ LE RAT</b>	<b>- 39 -</b>
3.1.1. LES RATS ET LEURS REGIMES ALIMENTAIRES	- 39 -
3.1.2. APPORTS ENERGETIQUES	- 41 -
3.1.3. APPORTS HYDRIQUES ET SODES	- 43 -
3.1.4. EVOLUTION DU POIDS	- 45 -
3.1.5. MESURE DE LA PRESSION ARTERIELLE MOYENNE (PAM)	- 45 -
3.1.6. SUIVI DE PARAMETRES PLASMATIQUES	- 47 -
<b>3.2. DISTRIBUTION DE L'HYALURONANE ET DE SON RÉCEPTEUR CD44 DANS LE REIN</b>	<b>- 49 -</b>
3.2.1. MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE IMMUNOHISTOCHIMIQUE	- 49 -
3.2.2. DISTRIBUTION DE L'HYALURONANE CHEZ LES RATS CONTROLES	- 49 -
3.2.3. DISTRIBUTION DE L'HYALURONANE CHEZ LES ANIMAUX TRAITÉS	- 54 -
3.2.4. DISTRIBUTION DU CD44 CHEZ LES RATS CONTRÔLES	- 56 -
3.2.5. DISTRIBUTION DU CD44 CHEZ LES ANIMAUX TRAITÉS	- 60 -
3.2.6. RELATION ENTRE LES MARQUAGES DE L'HYALURONANE ET DU CD44	- 60 -
3.2.7. DETECTION DU CD44 PAR WESTERN BLOT	- 62 -
3.2.8. DETECTION DE L'HYALURONANE PAR DOSAGES	- 62 -
<b>3.3. MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE DOSAGE DE L'HYALURONANE</b>	<b>- 64 -</b>
<b><u>4. DISCUSSION ET PERSPECTIVES</u></b>	<b><u>- 66 -</u></b>
<b>4.1. MISE AU POINT DU MODÈLE D'OBÉSITÉ</b>	<b>- 66 -</b>
<b>4.2. EFFET DU RÉGIME SUR LA PRESSION ARTÉRIELLE MOYENNE (PAM)</b>	<b>- 67 -</b>
<b>4.3. ÉTUDE DE LA DISTRIBUTION RÉNALE DE L'HYALURONANE</b>	<b>- 68 -</b>
<b>4.4. ÉTUDE DE LA DISTRIBUTION RÉNALE DU RÉCEPTEUR À L'HYALURONANE : CD44</b>	<b>- 70 -</b>
<b>4.5. MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE DOSAGE DE L'HYALURONANE</b>	<b>- 70 -</b>
<b><u>5. BIBLIOGRAPHIE</u></b>	<b><u>- 71 -</u></b>

# 1. Introduction

Le travail réalisé ici cherche à établir une relation entre la présence d'acide hyaluronique dans le rein et le développement d'une hypertension liée à l'obésité.

## *1.1. L'acide hyaluronique ou hyaluronane*

---

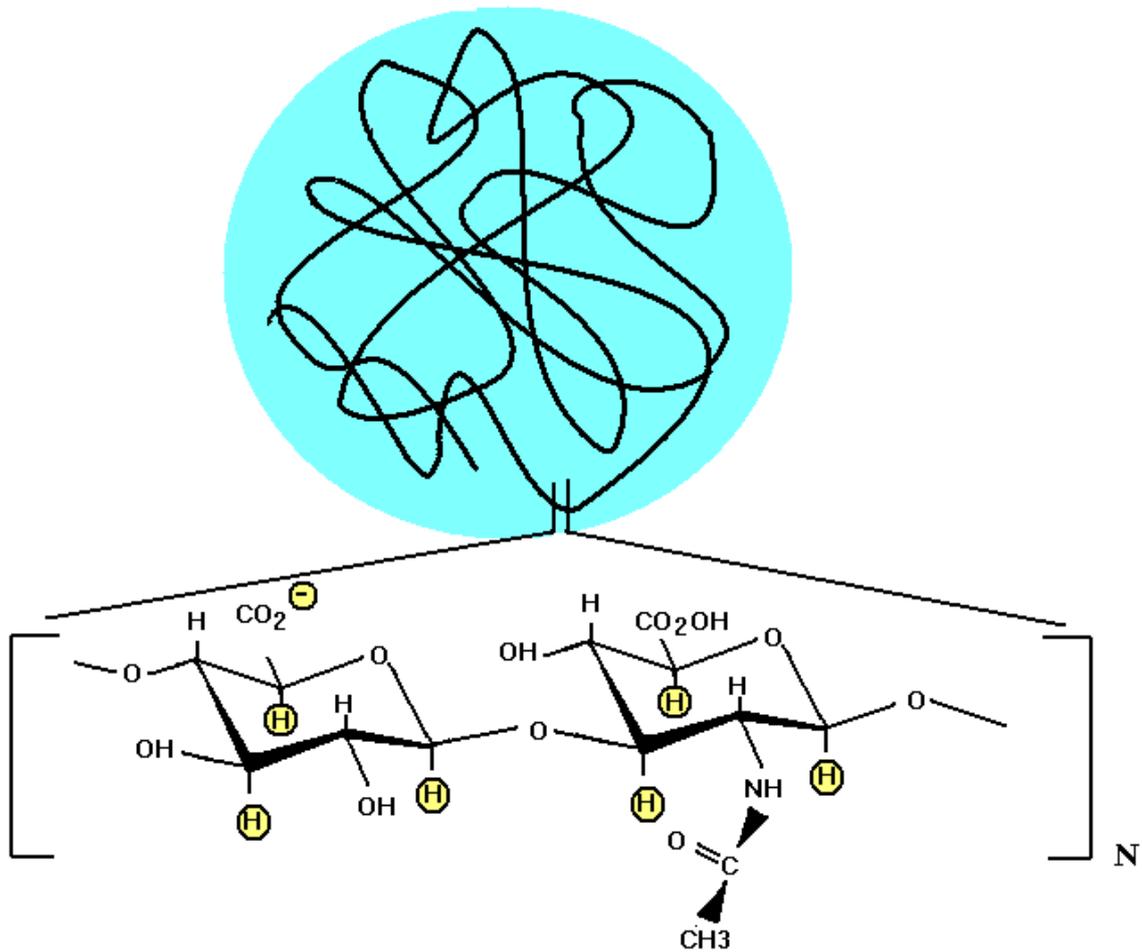
### **1.1.1. Structure**

La molécule qui nous intéresse est un polysaccharide mis en évidence, pour la première fois, dans l'humeur vitreuse bovine par Meyer et Palmer (1934) qui l'appelèrent acide hyaluronique (hyaloid, vitreux et acide uronique). *In vivo*, cette molécule se trouve sous une forme polyanionique à laquelle on donna le nom d'hyaluronane. Ce terme fut introduit dans les années 1980, afin de correspondre à la nomenclature biochimique des polysaccharides (Balazs et al., 1985).

L'hyaluronane est formé de la répétition d'un disaccharide : acide D-glucuronique- $\beta(1-4)$ -N-acetyl-D-glucosamine (**Fig. 1.1**). Ce disaccharide d'un poids moléculaire d'environ 400 Da peut être répété un très grand nombre de fois, jusqu'à plus de dix mille, au sein d'une seule molécule d'hyaluronane, laquelle peut atteindre plusieurs millions de Da (Laurent et al., 1996).

En solution, l'hyaluronane se présente sous la forme d'un ruban enroulé sur lui-même ayant une face hydrophobe et une autre hydrophile. La structure de la molécule est stabilisée par des ponts hydrogènes internes ainsi que par des interactions avec le solvant (Atkins, 1972 ; Scott, 1989). A des concentrations d'hyaluronane supérieures à 0,1 mg/ml, les rubans commencent à s'enchevêtrer les uns dans les autres de façon à former une sorte de sphère. Des « cross-links » apparaissent entre ces rubans suite à des interactions entre deux faces hydrophobes ou à de simples agencements stériques. Les molécules d'hyaluronane forment alors un réseau aléatoire contenant des « pores » plus ou moins grands qui permettent à l'eau, ainsi qu'à d'autres éléments tels que certains électrolytes, nutriments et protéines, de passer. Ce principe d'exclusion stérique peut influencer l'activité osmotique et le transport de l'eau

dans les matrices extracellulaires (Comper and Laurent, 1978 ; Scott, 1991 ; Laurent and Fraser, 1992).



**Fig. 1.1** L'hyaluronane est formé de la répétition d'un disaccharide : acide D-glucuronique- $\beta(1-4)$ -N-acetyl-D-glucosamine. Les atomes d'hydrogène entourés contribuent à la formation de la face hydrophobe de la molécule. En solution, l'hyaluronane se présente sous la forme d'un ruban enroulé sur lui-même.

### **1.1.2. Localisation et fonctions**

L'hyaluronane est un constituant majeur des matrices extracellulaires dans lesquelles il peut se trouver, selon sa concentration, sous forme de molécules isolées ou sous forme de réseau. Il est présent en abondance dans le liquide articulaire, dans la couronne des oocytes après ovulation, dans le derme et l'épiderme, dans le cordon ombilical, dans la médullaire rénale, etc.

L'hyaluronane n'est pas seulement un élément de structure passif, il est impliqué dans de nombreux mécanismes physiologiques et physiopathologiques. L'un des plus connus est l'infiltration tissulaire ou « homing » des lymphocytes. Pour rejoindre le site de l'inflammation, les lymphocytes T activés doivent d'abord sortir de la circulation sanguine. L'adhésion primaire entre le lymphocyte et la paroi vasculaire (étape de « rolling ») se fait notamment via l'interaction entre l'hyaluronane, qui se trouve à la surface des cellules endothéliales, et son récepteur CD44 situé sur le lymphocyte. L'expression de l'hyaluronane sur les cellules endothéliales est inductible par les cytokines inflammatoires (Nandi et al., 2000). L'hyaluronane est aussi impliqué dans plusieurs autres phénomènes inflammatoires et dans l'angiogenèse (Laurent et al., 1996).

L'hyaluronane joue aussi un rôle dans la régulation du développement tumoral (Bartolazzi et al., 1994). La croissance d'une tumeur telle que le mélanome semble fortement dépendante de sa capacité à fixer l'hyaluronane environnant.

### **1.1.3. Synthèse et dégradation de l'hyaluronane**

La synthèse d'une chaîne d'hyaluronane impose à la cellule une dépense énergétique très importante en raison de la taille de ce polymère. Ce processus est donc hautement régulé par la plupart des cellules. L'hyaluronane est synthétisé au niveau de la face interne de la membrane plasmique des cellules par l'addition de sucres à l'extrémité réductrice du polymère, tandis que l'extrémité non-réductrice sort dans l'espace péricellulaire. Les « hyaluronane synthases » sont des glycosyltransférases membranaires qui coordonnent la polymérisation et la translocation de l'hyaluronane hors de la cellule. Trois hyaluronane synthases ont été identifiées chez les vertébrés et celles-ci sont encodées par trois gènes différents (Lee and Spicer, 2000).

Le polysaccharide, une fois formé, est soit catabolisé localement par les cellules, soit emporté par la circulation (lymphatique ou sanguine) vers un autre lieu de dégradation qui peut être un ganglion lymphatique ou le foie. Dans ces organes, ce sont les cellules endothéliales délimitant les capillaires sinusoides et les cellules de Kupffer qui prennent en charge l'hyaluronane. La vitesse de renouvellement de l'hyaluronane est extrêmement rapide pour un constituant des matrices extracellulaires : de 0,3 à 1,0 µg par minute et par kg de poids corporel, de sorte que son temps de demi-vie est estimé à deux jours, voire moins (Laurent and Fraser, 1992).

Le mécanisme enzymatique responsable de la dégradation de l'hyaluronane se passe en deux phases : premièrement, la fragmentation du long polysaccharide par des hyaluronidases et, deuxièmement, la prise en charge des constituants monosaccharidiques par une  $\beta$ -D-glucuronidase et une  $\beta$ -N-acetyl-D-hexosaminidase.

A l'heure actuelle, plusieurs hyaluronidases ont été identifiées : hyal-1, hyal-2, hyal-3, hyal-4, et PH-20. Les gènes codant pour les hyaluronidases -1, -2 et -3 sont voisins sur le chromosome 3, tandis que le gène codant pour PH-20 est situé sur le chromosome 7 et a pour voisins le gène codant pour hyal-4 ainsi qu'un pseudogène appelé HYALP1 (Csoka et al., 2001). Hyal-1 est une enzyme plasmatique et urinaire, hyal-2 semble être associée à la membrane plasmique de la cellule via une ancre de type glycosylphosphatidylinositol et PH-20 est une hyaluronidase présente dans le sperme. Hyal-3 et hyal-4 n'ont pas encore été étudiées à l'heure actuelle.

## ***1.2. L'hyaluronane dans le rein***

---

### **1.2.1. Quelques aspects importants du rein**

Le rein est un organe complexe qui peut être divisé en deux parties, le cortex et la médullaire qui se divise elle-même en médullaire externe et en médullaire interne. La médullaire externe est formée de deux zones appelées OSOM pour la partie externe et ISOM pour la partie interne. La médullaire comprend les pyramides de Malpighi qui se terminent chacune par une papille. Chaque papille débouche dans ce qu'on appelle un calice mineur, lui-même entrant dans la formation d'un calice majeur au niveau du sinus rénal. L'uretère, bordé d'un épithélium de type urinaire (urothélium), entre dans le rein par le hile, et se trouve ainsi en contact avec plusieurs calices majeurs. Chez le rat, le modèle utilisé dans ce travail, la médullaire est unipyramidale et unipapillaire.

L'unité fonctionnelle du rein est le néphron. Celui-ci parcourt le rein du cortex à la médullaire interne, en traversant les deux couches de la médullaire externe, l'OSOM et l'ISOM (**Fig.1.2**). Il se constitue d'un corpuscule de Malpighi (ou glomérule) situé dans le cortex, suivi, dans l'ordre :

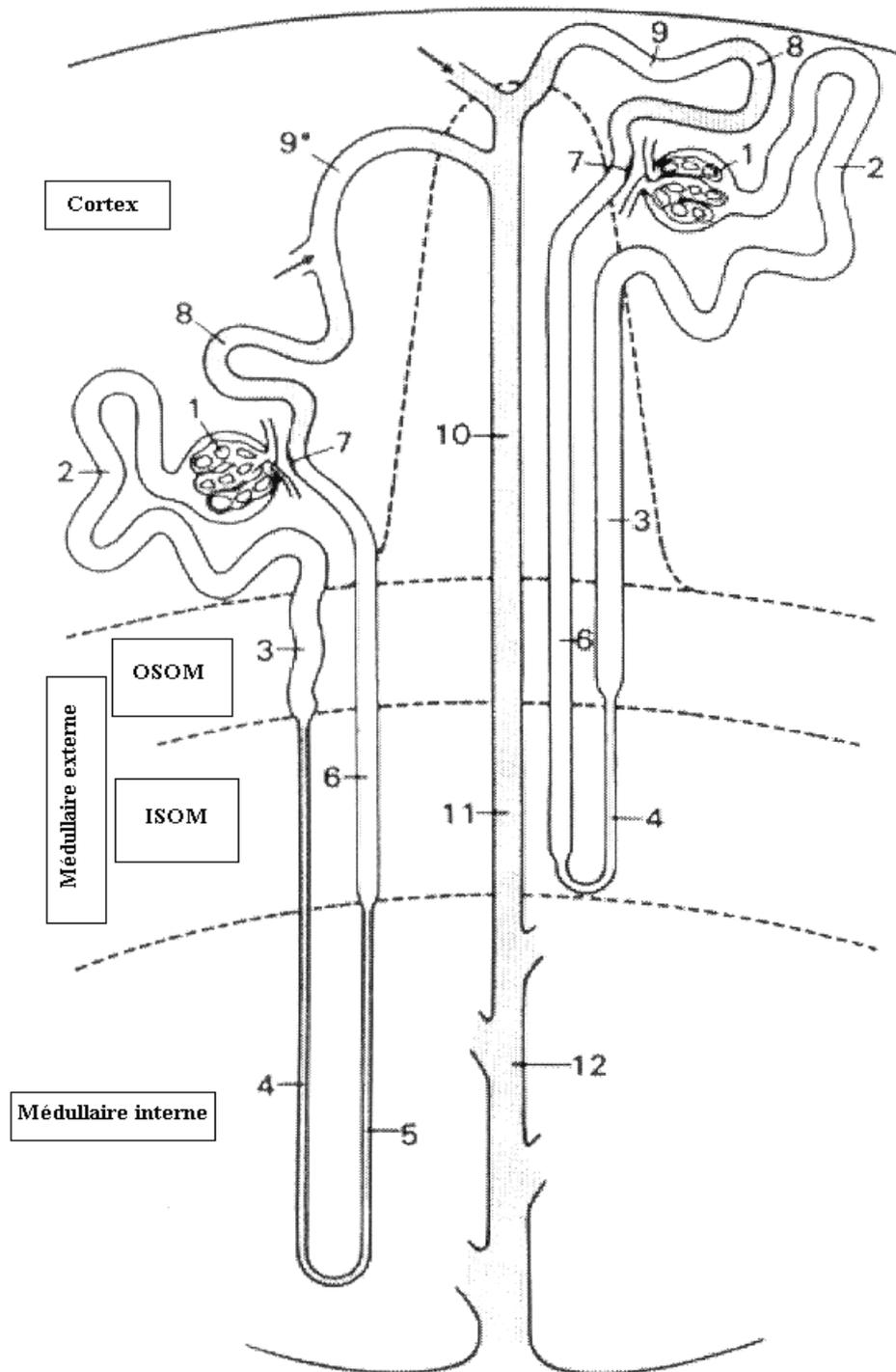
- d'un tubule proximal contourné, puis droit;
- de l'anse de Henlé avec sa partie descendante et sa partie ascendante ;
- d'un tubule contourné distal qui se prolonge en un tubule connecteur ;
- d'un tubule collecteur cortical, puis médullaire.

Les fonctions tubulaires présentent une distribution étagée en raison de la variabilité des capacités de transport d'eau et de sels qui existe entre les différentes parties du néphron.

Pour la compréhension des résultats de ce mémoire, il est bon de détailler la circulation rénale du rat, en particulier dans la partie médullaire, en se basant notamment sur les descriptions de Kriz et Kaissling (Kritz and Kaissling, 2000) réalisées chez le rat (**Fig. 1.3**).

L'artériole afférente entre dans le glomérule et s'y subdivise en de nombreux capillaires qui sont en contact avec la capsule de Bowman des glomérules. L'endothélium, la

membrane basale du capillaire, la membrane basale de la capsule de Bowman et les podocytes constituent ce qu'on appelle la barrière de filtration. Ensuite, l'artériole efférente sort du glomérule et donne naissance aux capillaires péri-tubulaires et aux vasa recta qui plongent dans la médullaire.



**Fig. 1.2** L'unité fonctionnelle du rein est le néphron, qui traverse les quatre zones principales du rein. Il se constitue de : 1, le glomérule rénal ; 2, le tubule contourné proximal ; 3, le tubule droit proximal ; 4, la partie descendante grêle de l'anse de Henlé ; 5, la partie ascendante grêle de l'anse de Henlé ; 6, la partie ascendante large de l'anse

**de Henlé aussi appelée tubule droit distal en histologie ; 7, la macula densa ; 8, le tubule contourné distal ; 9, le tubule de connexion ; 10, le canal collecteur cortical ; 11, le canal collecteur médullaire externe ; et 12, le canal collecteur médullaire interne.**

La vasculature médullaire provient exclusivement des artérioles efférentes sortant des glomérules juxtamédullaires. Ces artérioles efférentes entrent dans l'OSOM où elles se divisent en vasa recta descendants et en petites branches perpendiculaires qui forment le plexus capillaire de l'OSOM. Ce plexus est relativement clairsemé. Les vasa recta descendants entrent alors dans l'ISOM sous forme d'amas vasculaires (« vascular bundles ») ayant un aspect de poire. A intervalles réguliers, les vasa recta descendants quittent ces amas pour rejoindre le plexus capillaire du niveau médullaire adjacent. Seule une petite portion des vasa recta descendants pénètrent dans la médullaire interne, et seuls quelques uns atteignent la pointe de la papille. Le plexus capillaire de l'ISOM est beaucoup plus dense que celui de l'OSOM et donne l'apparence d'un réseau circulaire. Ce plexus semble servir d'isolant à la médullaire interne (Kritz and Kaissling, 2000) dans laquelle il est moins dense et forme un réseau allongé.

Le rein joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie des fluides corporels, en régulant l'excrétion d'eau et d'électrolytes. Or, le volume du liquide extracellulaire est un déterminant majeur de l'équilibre de la pression artérielle. La régulation complexe des fonctions rénales est assurée par diverses voies impliquant des nerfs, des hormones, des mécanismes intrarénaux et des composants structurels (Guyton and Hall, 1996). Il est impossible de présenter l'ensemble de ces systèmes mais, dans le cadre de ce travail, il est opportun d'insister sur les deux points suivants :

- 1- Le fonctionnement du néphron est influencé par l'interstitium dans lequel il baigne, notamment par sa pression hydrostatique et sa pression osmotique.
- 2- Les artérioles afférentes et efférentes, ainsi que certaines parties du néphron (surtout la partie proximale), et les cellules à rénine de l'appareil juxtaglomérulaire sont contrôlées en partie par une innervation orthosympathique (DiBona and Kopp, 1997). Une augmentation de l'activité sympathique provoque d'une part la contraction des artérioles, ce qui peut avoir pour effet une diminution du taux de filtration glomérulaire, et d'autre part, une augmentation de réabsorption tubulaire d'eau et d'électrolytes. De plus, les artérioles afférentes ainsi stimulées relâchent plus de rénine, ce qui a pour effet d'augmenter les niveaux plasmatiques en angiotensine II et en aldostérone, deux hormones qui augmentent aussi la réabsorption d'eau et de sels.

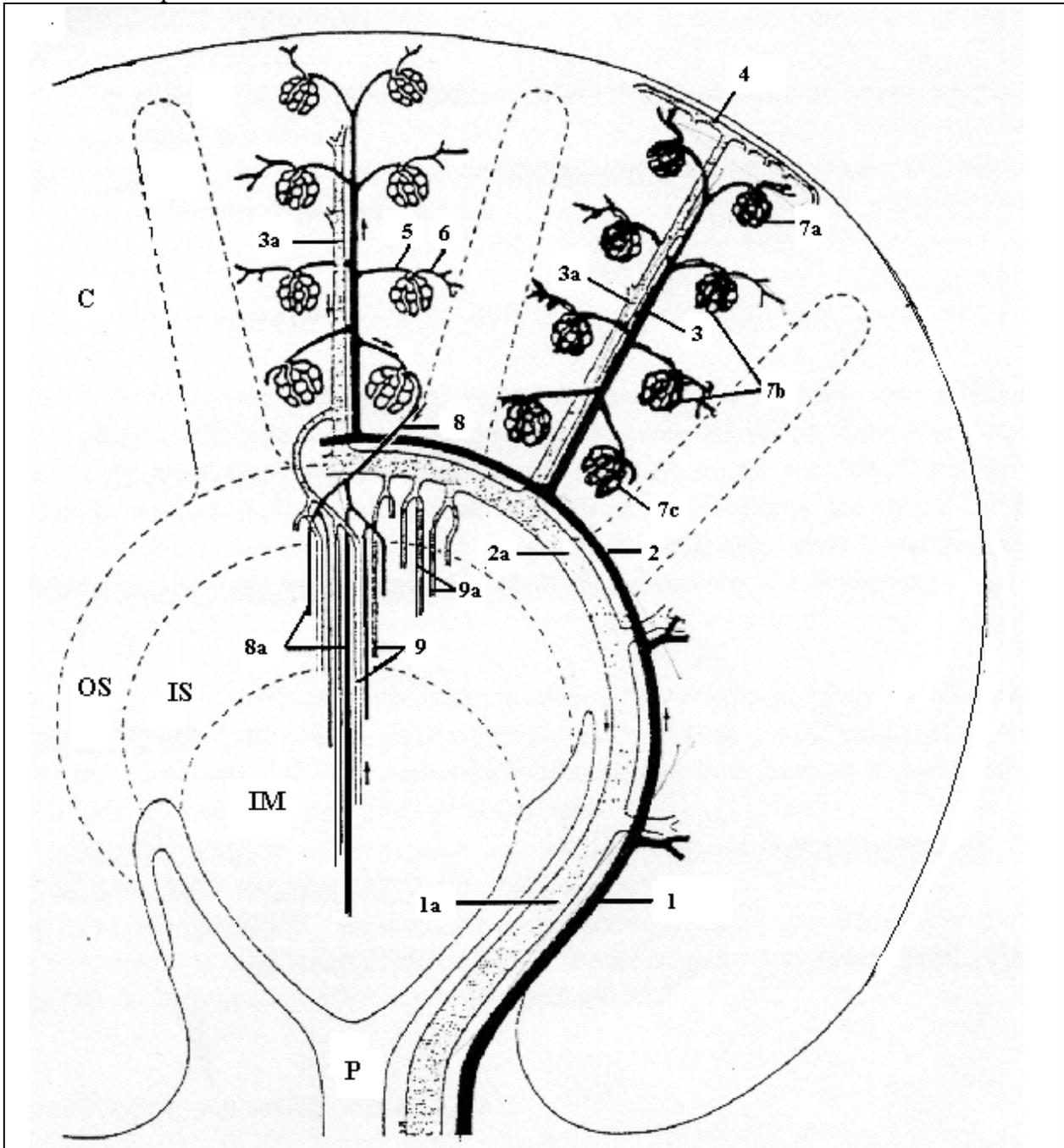
### **1.2.2. L'interstitium rénal**

L'interstitium péritubulaire est impliqué dans pratiquement toutes les fonctions du rein et principalement dans le transport tubulaire de fluide et de solutés. L'interstitium rénal est constitué des cellules interstitielles et d'une matrice extracellulaire.

#### **Les cellules interstitielles**

*Les fibroblastes*

La plupart des cellules de l'interstitium rénal sont des fibroblastes. Ceux-ci sont interconnectés par des jonctions (« gap junctions ») et sont attachés aux tubules et aux vaisseaux par leurs longues excroissances cytoplasmiques. Dans la médulla, les fibroblastes liés aux vaisseaux et aux tubules sont allongés perpendiculairement à ceux-ci, ce qui leur donne un aspect en échelle.



**Fig. 1.3** Schéma de la vascularisation rénale. Les capillaires péricoronaux ne sont pas représentés.

C, Cortex ; OS, OSOM ; IS, ISOM ; IM, Médulla Interne ; P, Papille.

1, 1a, artère et veine interlobaire.

2, 2a, artère et veine arquée.

3, 3a, artère et veine corticale radiale.

4, veine stellaire.

5, artériole afférente.

6, artériole efférente.

7a, 7b, 7c, touffe capillaire d'un glomérule superficiel, mi-cortical et juxta-médullaire.

8, 8a, artériole efférente juxtamédullaire et vasa recta descendants.

9, 9a, vasa recta ascendants.

Ainsi, les fibroblastes forment en quelque sorte la trame du rein. Ils sécrètent aussi de nombreuses substances paracrines. Par exemple, en cas d'inflammation, certains sécrètent transitoirement des chémokines qui agissent comme un premier système d'alarme, en recrutant des cellules immunitaires au site agressé. Selon leur localisation dans le rein et leur activité, les fibroblastes peuvent présenter des phénotypes différents ; en cas d'inflammation notamment, ils peuvent se transformer en myofibroblastes riches en  $\alpha$ -actine, un constituant des cellules musculaires lisses (Kaissling et al., 1996 ; Kriz and Kaissling, 2000).

### *Les cellules du système immunitaire*

Les cellules les plus représentées dans ce groupe sont les cellules présentatrices d'antigènes, c'est-à-dire les cellules dendritiques. Elles sont présentes dans les espaces interstitiels périlitubulaires et c'est dans l'ISOM que leur incidence est la plus élevée. Elles présentent une certaine ressemblance avec les fibroblastes d'un point de vue morphologique mais elles ne possèdent pas leurs complexes de jonction, leurs connections avec les tubules et vaisseaux, ni l'épaisse couche d'actine sous leur membrane plasmique.

Les macrophages se distinguent des cellules dendritiques par leur contenu élevé en lysosomes primaires et secondaires. De plus, ils se situent uniquement dans la capsule rénale, dans le mur du pelvis et dans le tissu conjonctif périartériel. On peut aussi trouver des lymphocytes mais ils sont rares dans un rein sain. Les différences de morphologie entre ces types cellulaires n'étant pas toujours flagrantes, la distinction se base plus souvent sur la mise en évidence de protéines membranaires différentes (Kaissling et al., 1996).

### **La matrice extracellulaire**

La matrice extracellulaire est formée de protéoglycanes et de glycoprotéines, de fibrilles et de microfibrilles, de plusieurs types de collagènes, et de liquide interstitiel, ce qui lui donne une consistance gélatineuse. L'hyaluronane est le principal glycosaminoglycane présent dans cette matrice ; les cellules rénales qui le synthétisent n'ont pas encore été déterminées avec précision, même si certains pensent, sur base d'expériences réalisées *in vitro*, qu'il s'agit des cellules interstitielles de la médullaire (Pitcock et al., 1988 ; Hansell et al., 1999). Des expériences réalisées au Laboratoire de Physiologie et de Pharmacologie ont montré que les cellules tubulaires de la médullaire interne synthétisent autant d'hyaluronane que les cellules interstitielles (Flamion et al., 2000).

La proportion de tissu interstitiel n'est pas la même dans toutes les parties du rein, elle augmente progressivement du cortex (7 à 9 % chez le rat) à la médullaire (de 10 % dans la médullaire externe à 40 % à la pointe de la papille). Le phénotype des cellules interstitielles varie aussi dans les différentes parties du rein. Ainsi les fibroblastes se chargent en gouttelettes lipidiques à partir de la médullaire et leur proportion augmente de l'ISOM à la papille. Tout ceci suggère que le rôle joué par l'interstitium dans les fonctions rénales varie selon la zone du rein considérée (Kriz and Kaissling, 2000).

### 1.2.3. Localisation de l'hyaluronane dans le rein

Mettre l'hyaluronane en évidence dans un tissu n'est pas chose facile. Historiquement, ce sont des colorants tels que le bleu de toluidine et le bleu Alcian qui furent utilisés (Reale et al., 1986), jusqu'à la découverte de protéines permettant une détection spécifique de l'hyaluronane, appelées protéines de liaison de l'hyaluronane (hyaluronan-binding proteins ou HABP), qui seront détaillées plus loin (Delpech and Havalent, 1981).

Le bleu de toluidine est un colorant basique qui est métachromatique avec les glycoprotéines riches en eau ; il colore l'hyaluronane mais aussi de nombreux autres éléments à fonctions acides tels que les acides nucléiques, ainsi que d'autres composants de la matrice extracellulaire (héparan sulfate, chondroïtine sulfate, etc), ce qui pose un sérieux problème de spécificité de cette technique. Le bleu Alcian est un cation tétravalent qui permet de révéler les fonctions acides ionisées au pH utilisé. Ainsi, à un pH de 1,3, on peut colorer l'hyaluronane, mais d'autres glycosaminoglycanes sont aussi marquées (Mowry, 1956).

Ce n'est qu'à partir de 1985 que l'on a pu marquer l'hyaluronane spécifiquement, et ce, en utilisant des protéines de haute affinité. Ces HABP sont isolées à partir du cartilage ou du cerveau, et peuvent être biotinylées afin de détecter la présence de l'hyaluronane dans une coupe histologique (Wells et al., 1990 ; Hansell et al., 2000).

Dans le rein, l'hyaluronane présente une distribution assez hétérogène. On le trouve principalement au niveau de la médullaire interne et en particulier dans la papille. Il est aussi présent dans la médullaire externe et dans le cortex, mais en quantités nettement moindres (Wells et al., 1990 ; Johnsson et al., 1996 ; Flamion et al., 1997 ; Johnsson et al., 1997 ; Hansell et al., 2000). Dans le cortex, l'hyaluronane ne se trouve que dans les tissus conjonctifs périvasculaires et dans le tissu conjonctif sous la capsule, tandis que les glomérules et les tubules ne sont pas marqués. Au niveau de la médullaire, l'hyaluronane se situe entre les tubules, mais pas dans les cellules tubulaires (Wells et al., 1990).

### 1.2.4. Rôles de l'hyaluronane dans le rein

Dans le rein, l'hyaluronane pourrait simplement servir de soutien aux tubules et aux vaisseaux sanguins de la médullaire. Mais d'autres rôles sont à envisager en raison des nombreuses propriétés de cette molécule.

Il a été démontré *in vivo* que le contenu en hyaluronane de la papille rénale de rat était augmenté durant la diurèse et diminué durant l'antidiurèse (Flamion et al., 1997 ; Hansell et al., 2000 ; Göransson et al., 2002). Ceci suggère un rôle important de l'hyaluronane papillaire dans la réabsorption ou la non-réabsorption de l'eau et par conséquent dans le mécanisme de concentration des urines. On peut penser qu'une quantité élevée d'hyaluronane dans la papille y crée une sorte « d'œdème fonctionnel » qui s'oppose à l'entrée d'eau dans le tissu et facilite ainsi son excrétion urinaire (Hansell et al., 2000).

### **1.2.5. Accumulation rénale d'hyaluronane en conditions pathologiques**

Parmi les modifications rénales qui apparaissent en réponse à certaines pathologies ou à certaines agressions, on trouve notamment l'accumulation d'hyaluronane dans l'une ou l'autre région du rein.

Par exemple, lorsqu'on obstrue l'uretère d'un rein, on observe une augmentation transitoire d'hyaluronane dans la papille de ce rein, mais aussi dans l'autre rein qui, lui, n'a pas été lésé (Johnsson et al., 1997). Lors d'une ischémie chaude du rein, suite à l'obstruction de l'artère rénale, c'est principalement une accumulation corticale d'hyaluronane qui se produit (Johnsson et al., 1996). Sa concentration augmente aussi, mais dans une moindre mesure, dans la médullaire externe et dans la papille. L'hyaluronane cortical augmente aussi lors de la réaction de rejet faisant suite à une greffe de rein (Wells et al., 1990).

Une autre pathologie où l'on pourrait observer une accumulation rénale d'hyaluronane est l'obésité, mais cette relation sera discutée plus loin.

### **1.2.6. Les protéines liant l'hyaluronane**

L'hyaluronane peut être associé à de nombreuses molécules dont des protéoglycanes (agrécan, versican, neurocan, hyaluronectine...), des récepteurs (CD44, RHAMM, LYVE-1), et d'autres protéines comme TSG-6 et la protéine de liaison du cartilage. On regroupe sous le terme de « hyaluronan-binding proteins » (HABP) les protéines ou les domaines protéiques capables de lier l'hyaluronane.

L'agrécan est la principale protéoglycane présente dans le cartilage articulaire. Elle est composée de trois domaines : G1, G2 et G3. C'est le domaine G1 qui interagit avec l'hyaluronane (liaison non-covalente) et avec la protéine de liaison du cartilage (« link protein »), de manière à former un triple complexe dans la matrice extracellulaire (Watanabe et al., 1997). Le domaine G1 présente deux motifs identiques et est appelé module de liaison. Cette répétition en tandem est aussi présente dans d'autres protéoglycanes. Par contre, on ne trouve qu'une seule copie de ce motif sur le récepteur de surface à l'hyaluronane CD44 et sur une protéine de matrice sécrétée en condition inflammatoire, le TSG-6.

La « protéine de liaison » du cartilage est une petite glycoprotéine de 40 à 48 kDa qui stabilise les agrégats de protéoglycanes en se liant d'une part à l'agrécan et d'autre part à l'hyaluronane. En l'absence de cette protéine de liaison, les agrégats sont plus petits et moins stables (Neame and Barry, 1994). Cette protéine de liaison possède une structure très similaire au domaine G1 de l'agrécan, suggérant un gène ancestral commun (Hardingam and Muir, 1972).

La versicane est une grande protéoglycane qui a été isolée à partir de fibroblastes humains. Elle présente une homologie de séquence avec le domaine G1 de l'agrécane c'est-à-dire le domaine qui lie l'hyaluronane (LeBaron et al., 1992).

Une autre glycoprotéine liant l'hyaluronane a été identifiée dans le cerveau par chromatographie d'affinité et par des tests enzymatiques. On lui donna le nom d'hyaluronectine (Delpech and Halavent, 1981).

La protéine produite en conditions inflammatoires, TSG-6 (« secretory tumor necrosis factor-inductible protein »), fait aussi partie des HABP. Le TSG-6 présente un module de liaison à l'hyaluronane unique, tout comme le récepteur CD44. Or, la production de TSG-6 est inductible par le TNF (Tumor Necrosis Factor) ou par l'IL-1 (interleukine1), suggérant une implication du TSG-6 dans les interactions cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire durant l'inflammation et la genèse des tumeurs (Lee et al., 1992).

Il est possible d'isoler des HABP à partir de cartilage par différentes techniques (centrifugation dans un gradient de densité, colonne d'affinité,...).

### ***1.3. Le récepteur à l'hyaluronane CD44***

---

#### **1.3.1. Découverte et localisation**

Le CD44 fait partie des HABP. Il fut d'abord identifié comme antigène de différenciation à la surface des leucocytes humains et plus particulièrement sur les lymphocytes T auxquels il pourrait servir de molécule d'attachement à l'hyaluronane endothélial (Dalchau et al., 1980). Il fut ensuite mis en évidence en surface d'autres cellules comme les kératinocytes de la peau, les macrophages, les granulocytes, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, ou encore les cellules tubulaires rénales, où ses rôles restent obscurs (Underhill, 1992 ; Isacke and Yarwood, 2002). Le CD44 est aussi présent sur de nombreuses cellules tumorales, ce qui amène à postuler son implication dans le développement des cancers, tant au niveau de leur croissance que de l'infiltration métastatique (Bartolazzi et al., 1994 ; Martin et al., 2003 ). Il est aussi impliqué dans le développement embryonnaire, en particulier celui du thymus (Patel et al., 1995), et dans la stratification des kératinocytes fœtaux (Tuhkanen et al., 1999).

#### **1.3.2. Structure**

La famille de glycoprotéines appelée CD44 dérive d'un seul gène de 50 à 60 kb situé sur le bras court du chromosome 11 humain et constitué d'au moins 20 exons (Ponta et al., 1998). Les exons 1 à 16 encodent le domaine extracellulaire de la protéine, l'exon 17 encode un court domaine transmembranaire et les exons 18 et 19 encodent le domaine cytoplasmique. Il existe une énorme hétérogénéité d'ARNm produits par épissage alternatif des exons 5 à 14

de ce gène (« exons variables »). Ces exons sont capables d'être réarrangés individuellement, ce qui permet plus de 700 combinaisons différentes pour la séquence du domaine extracellulaire.

Lorsque tous ces exons sont épissés, on obtient le CD44s (standard), tandis que tous les CD44 possibles générés par l'épissage alternatif de ces exons portent le nom de CD44v (variables).

C'est le CD44s que l'on trouve dans la plupart des tissus d'un organisme adulte, les CD44v étant présents à la fois chez l'adulte et chez l'embryon, mais de façon nettement plus restreinte. Les exons 18 et 19 peuvent aussi être réarrangés, générant ainsi deux queues cytoplasmiques différentes, une courte et une longue.

Il existe une autre source de diversité dans les molécules CD44 : elles peuvent être O-glycosylées et N-glycosylées différemment. Ces substitutions peuvent représenter jusqu'à plus de la moitié du poids moléculaire de la protéine, amenant habituellement celui-ci aux alentours de 80-100 kDa (Underhill, 1992 ; Ponta et al., 1998 ; Isacke and Yarwood, 2002).

Le CD44 est décrit comme étant une glycoprotéine elliptique, phosphorylée et chargée négativement au pH physiologique (**Fig.1.4**). Son domaine cytoplasmique est associé aux filaments d'actine de la cellule, tandis que son domaine extracellulaire peut lier l'hyaluronane, en reconnaissant une séquence de six sucres, mais aussi le collagène et l'ostéopontine (Culty et al., 1992).

### **1.3.3. Le CD44 en tant que récepteur à l'hyaluronane**

Seules certaines formes de CD44 peuvent lier l'hyaluronane, les autres en sont incapables. Ceci peut s'expliquer par des différences de glycosylation car les molécules fortement O-glycosylées ont une capacité plus élevée à lier l'hyaluronane (Aruffo et al., 1990 ; Underhill, 1992). Cette capacité de liaison différente peut aussi s'expliquer par des réarrangements exoniques différents, par des « clustering » dans le plan de la membrane ou encore par une modulation différente par le domaine cytoplasmique (Isacke and Yarwood, 2002). Ainsi, la liaison de l'hyaluronane en surface de la cellule est souvent multivalente, c'est-à-dire nécessitant le recrutement de plusieurs molécules de CD44 pour lier une seule molécule d'hyaluronane. Si le cytosquelette assure le rassemblement des molécules de CD44 en surface, celles-ci auront plus de chance de lier l'hyaluronane, via des interactions multiples, que si elles sont isolées. La liaison du CD44 au cytosquelette contrôle donc indirectement la fixation du CD44 à son ligand (Underhill, 1992).

Le domaine amino-terminal du CD44 est homologue au domaine amino-terminal des protéines de liaison du cartilage qui ont, elles aussi, la capacité de lier l'hyaluronane. En fait, c'est la portion commune à ces deux types de molécules qui fixe l'hyaluronane. Huit résidus semblent nécessaires à la fixation de ce polysaccharide ou à la stabilisation de cette interaction : Lys-38, Arg-41, Tyr-42, Arg-78, Tyr-79, Asn-100, Asn-101, et Tyr-105. Parmi ces résidus, quatre jouent un rôle critique dans la fixation de l'hyaluronane, la liaison étant impossible s'ils sont mutés (Arg-41, Tyr-42, Arg-78 et Tyr-79). Les huit résidus formant le site de liaison ont aussi été mis en évidence dans d'autres molécules comme les lectines calcium-dépendantes, la mannose-binding protein, et la E-sélectine et ce, au niveau de leur site de liaison à un hydrate de carbone (Bajorath et al., 1998).

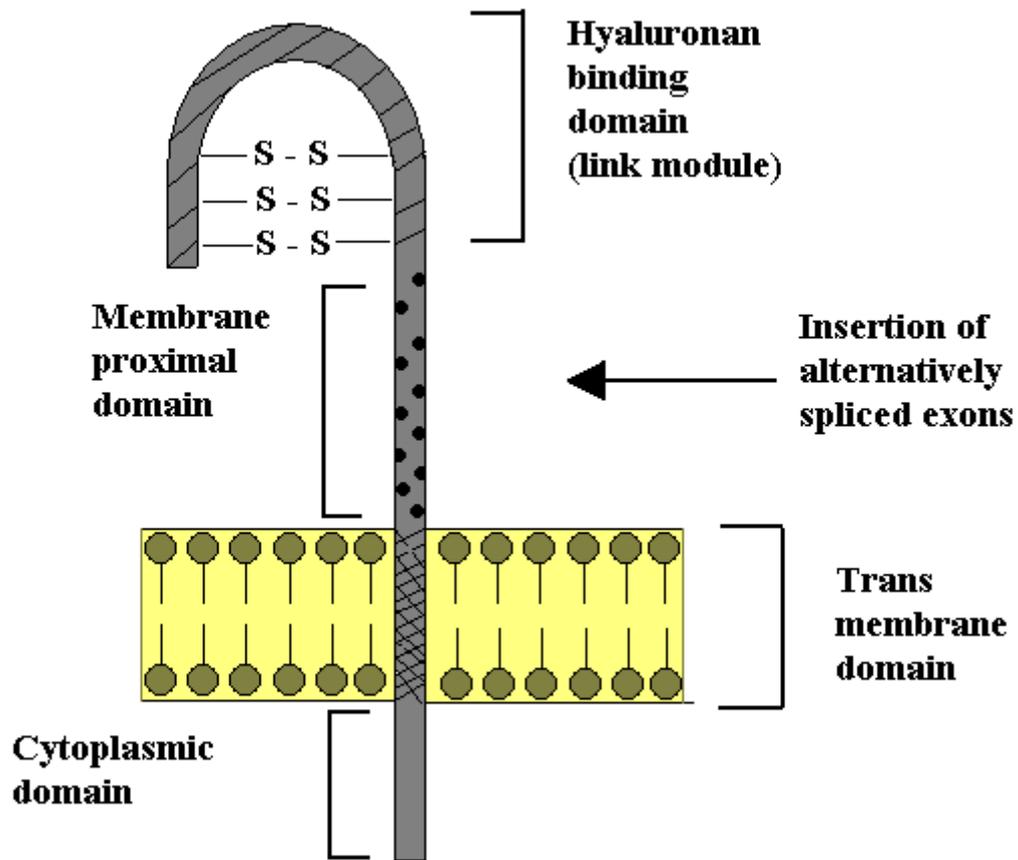


Fig. 1.4 Structure du récepteur à l'hyaluronane CD44.

### **1.3.4. Rôle du CD44 dans la dégradation de l'hyaluronane**

Dans tous les tissus, l'hyaluronane subit un remplacement très rapide malgré sa taille relativement imposante et des études récentes suggèrent que le CD44 pourrait intervenir dans ce processus.

L'une des hypothèses propose un mécanisme de dégradation de l'hyaluronane en trois étapes successives (Culty et al., 1992) : premièrement, l'adhésion de l'hyaluronane à la surface cellulaire ; deuxièmement, son endocytose ; et troisièmement, sa dégradation par les hydrolases acides. L'étape de fixation à la cellule, qui est l'étape cruciale de ce processus, se fait par le CD44 enchâssé dans la membrane plasmique. L'équipe de Martine Culty proposa un mécanisme d'« endocytose médiée par récepteur », par opposition à un mécanisme de phagocytose non spécifique, après avoir observé que le blocage du CD44 à l'aide d'un anticorps inhibait l'entrée d'hyaluronane dans la cellule. L'association du CD44 avec le cytosquelette de la cellule tend à confirmer cette hypothèse.

Une fois la membrane plasmique passée, l'hyaluronane se retrouve dans des granules de tailles différentes avant d'être digéré. La digestion de l'hyaluronane serait réalisée par des enzymes lysosomales car d'une part, le récepteur CD44 est dépourvu d'activité hyaluronidasique et, d'autre part, la dégradation de l'hyaluronane est inhibée par la chloroquine et le chlorure d'ammonium, substances qui neutralisent l'acidité du compartiment lysosomal.

La vitesse de dégradation de l'hyaluronane par les cellules pourrait être liée au nombre de récepteurs CD44 disponibles en surface. Ainsi des fibroblastes 3T3 infectés par le SV40 dégradent l'hyaluronane plus rapidement que des fibroblastes normaux ; or les fibroblastes infectés ont plus de récepteurs CD44 à leur surface. D'autres cellules semblent présenter le même mécanisme d'endocytose et de dégradation de l'hyaluronane, par exemple les macrophages et les cellules dendritiques. Néanmoins, l'hypothèse selon laquelle le CD44 jouerait un rôle clé dans la dégradation de l'hyaluronane ne peut s'appliquer à tous les types cellulaires. Ainsi, les cellules endothéliales du foie dégradent aussi l'hyaluronane (démontré chez le hamster et la souris) bien qu'elles soient dépourvues de CD44. La présence d'un autre type d'HABP sur ces cellules a été démontré et celui-ci assure une fonction similaire au CD44 (Weigel et al., 2002).

### **1.3.5. Autres rôles du CD44**

Le CD44 est impliqué dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques tels que l'activation des lymphocytes, l'hématopoïèse, la migration cellulaire, la formation des métastases, le guidage des axones dans le système nerveux et la communication entre cellules épithéliales et mésenchymateuses durant l'embryogenèse (Ponta et al., 1998).

### **1.3.6. Localisation du CD44 dans le rein**

Le marquage du CD44 dans le rein de différents animaux a permis de mettre ce récepteur en évidence sur les structures suivantes : certaines cellules intra-glomérulaires, les cellules épithéliales du feuillet pariétal de la capsule de Bowman, les tubules médullaires et occasionnellement quelques tubules corticaux (Lewington et al., 2000). Chez l'homme, le CD44 est à peine détectable dans le rein en conditions normales, sauf sur quelques leucocytes de passage, sur les capillaires péri-tubulaires et sur les fibroblastes interstitiels (Florquin et al., 2002). Dans l'ensemble, la localisation intrarénale du CD44 reste insuffisamment connue.

La concentration du CD44 et sa localisation dans le rein varient dans certaines conditions. Par exemple, dans le cas de la néphropathie à IgA (chez l'homme), le CD44 apparaît dans les myofibroblastes périglomérulaires, dans les cellules mésangiales où son expression est segmentaire, dans les glomérules présentant une croissance cellulaire, sur les fibroblastes interstitiels, à la surface des cellules épithéliales tubulaires et parfois même à l'intérieur de celles-ci dans les zones de lésion tubulo-interstitielle. L'intensité de marquage augmente avec l'importance de la lésion tubulo-interstitielle (Florquin et al., 2002 ; Sano et al., 2001). Des variations du CD44 sont aussi observables dans d'autres pathologies comme le carcinome rénal (Rioux-Leclercq, 2001) et l'ischémie aigüe (Lewington et al., 2000).

L'expression du CD44 rénal n'a pas encore été étudiée dans le cas de l'obésité.

## ***1.4. L'hypertension liée à l'obésité***

---

### **1.4.1. Epidémiologie**

L'obésité et l'hypertension sont deux pathologies très fréquentes dans nos sociétés et leur prévalence augmente de façon constante (Mikhail et al., 1999 ; Burt et al., 1995). De nombreuses études épidémiologiques ont démontré une interaction entre l'obésité et l'hypertension. Il est connu depuis longtemps que la prévalence de l'hypertension est de 1,5 à 3 fois plus élevée chez les individus reconnus obèses que chez les personnes dont le poids est considéré comme normal (Stamler et al., 1978). Une autre observation confirme cette association : lorsqu'une personne obèse perd du poids, sa pression sanguine diminue aussi (Montani et al., 2002).

Le plus gros problème vient du fait que l'obésité et l'hypertension prédisposent aux maladies cardiovasculaires. D'un côté, l'obésité prédispose à l'hypertension et donc augmente la prévalence des maladies cardiovasculaires. Et, d'un autre côté, les problèmes de cœur (ou autres) amènent l'inactivité et donc la prise de poids suivie d'hypertension qui aggrave les problèmes cardiovasculaires. L'obésité, l'hypertension et les maladies cardiovasculaires forment ce qu'on pourrait appeler un « triangle vicieux » (Montani et al., 2002). Étudier l'étiologie de l'association entre hypertension et obésité pourrait aider à la mise au point d'un traitement ou d'une prévention efficace.

### 1.4.2. Hypothèses étiologiques

La corrélation qui existe entre l'obésité et l'hypertension peut être expliquée, soit par l'existence d'un facteur favorisant commun à ces deux maladies, soit par une relation de cause à effet. C'est cette deuxième hypothèse, considérant l'hypertension comme une conséquence de l'obésité, qui est actuellement privilégiée.

Quelques théories tentent d'expliquer comment l'obésité entraîne l'hypertension. Toutes partent des observations suivantes :

- Les individus obèses ont besoin d'une pression intrarénale plus élevée pour éliminer la même quantité de sodium ;
- L'excrétion de charges supplémentaires de sodium est ralentie ;
- La filtration glomérulaire est augmentée de même que le flux sanguin rénal ;
- L'activité du système nerveux orthosympathique est plus élevée chez les personnes obèses, y compris dans la branche rénale de ce système.

L'équipe de John Hall, de l'université du Mississippi, est particulièrement active dans la recherche d'une relation entre l'obésité et l'hypertension (Hall, 2000 ; Hall, 2002). Selon eux, le lien entre ces deux pathologies peut s'expliquer, comme dans toute hypertension dite « essentielle », par un déplacement de la courbe de pression – natriurèse vers les hautes pressions (Hall, 1997). Cette courbe représente la capacité intrinsèque du rein à éliminer une quantité donnée de sodium à une pression donnée ; l'hypertension « essentielle » pourrait s'expliquer par un défaut intrarénal qui entraînerait le déplacement de cet équilibre vers une zone de pressions plus élevées (Guyton, 1987).

Théoriquement, le déplacement peut être causé soit par une diminution du taux de filtration glomérulaire, soit par une augmentation de la réabsorption tubulaire de sodium. Cependant, des études chez le chien et chez l'homme indiquent que l'obésité est habituellement associée à une vasodilatation rénale plutôt qu'à une vasoconstriction, à une augmentation du flux rénal plasmatique et à une augmentation de la filtration glomérulaire. Il n'est donc pas possible d'expliquer le déplacement de la courbe pression - natriurèse par cette voie. Il faut alors se tourner vers une réabsorption tubulaire de sodium augmentée (Hall, 1997). Plusieurs mécanismes sont possibles : l'hyperinsulinémie et la résistance à l'insuline (qui apparaissent rapidement en cas d'obésité), l'activation du système rénine-angiotensine, ou encore une augmentation d'activité du système nerveux orthosympathique. Passons-les brièvement en revue.

Le rôle de l'hyperinsulinémie et de la résistance à l'insuline dans le développement de l'hypertension liée à l'obésité a été suggéré sur base de deux observations : premièrement, il existe une corrélation entre la pression sanguine et la concentration plasmatique d'insuline chez les sujets obèses hypertendus ; et, deuxièmement, il a été démontré dans plusieurs études que l'insuline a de multiples effets sur le rein et sur l'activité sympathique qui, s'ils sont maintenus pendant un temps, peuvent altérer la fonction rénale et augmenter la pression sanguine (Landsberg, 1992). Cependant, d'autres études ont montré que l'insuline a aussi des effets sur le système cardiovasculaire qui, eux, devraient amener une réduction de la pression sanguine. C'est pourquoi, à l'heure actuelle, le rôle de l'hyperinsulinémie dans l'hypertension liée à l'obésité reste controversé (Brands et al., 1995).

Une autre hypothèse proposée pour expliquer l'hypertension liée à l'obésité est dérivée de l'observation suivante : chez la plupart des sujets obèses, l'activité plasmatique de la rénine est augmentée. Ceci laisse supposer qu'une activation du système rénine-angiotensine a lieu et qu'elle pourrait être la cause de la réabsorption sodée augmentée ainsi que du déplacement de la courbe pression-natriurèse (Hall, 2000 ; Hall, 2003). Il a aussi été montré que le blocage de la formation d'angiotensine II par l'administration d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion atténue l'hypertension associée à un régime riche en matières grasses chez le chien. En plus d'une diminution de pression sanguine, les chiens obèses traités présentaient aussi des niveaux plasmatiques plus faibles de noradrénaline (signe d'une activation moindre du système nerveux sympathique) et de glucose sanguin à jeun (Robles et al., 1993). Ces observations suggèrent qu'une formation accrue d'angiotensine II pourrait contribuer, en partie, à l'hypertension induite par l'obésité. Cependant, ce mécanisme est loin d'être spécifique à l'excès de poids.

L'obésité active aussi le système nerveux orthosympathique (Mikhail et al., 1999 ; Hall, 2000). Il a été montré que l'activation sympathique du rein provoque la rétention de sodium ainsi qu'une augmentation de pression artérielle, tandis que la dénervation du rein atténue ces mêmes effets (Kassab et al., 1995). Néanmoins, les mécanismes par lesquels l'obésité active le système nerveux orthosympathique sont toujours inconnus. Il est possible que ce soit la leptine, via ses interactions avec les neuropeptides de l'hypothalamus (dont les récepteurs à la mélanocortine-4), qui serve de lien entre l'excès de poids et une activité orthosympathique augmentée au niveau du rein (Hall, 2000 ; Hall et al., 2001). Mais il est aussi possible que la leptine agisse sur la pression artérielle par d'autres voies ; par exemple, par une activation adrénergique du cœur (Shek et al., 1998). Ce qui est sûr, c'est que des souris transgéniques surexprimant la leptine développent de l'hypertension (Hall et al., 2001). Une autre voie par laquelle l'obésité pourrait augmenter l'activité du système nerveux orthosympathique est celle des acides gras. Les niveaux élevés d'acides gras pourraient agir directement sur les centres vasomoteurs du cerveau ou indirectement via des voies afférentes dérivées du foie. L'infusion d'acides gras libres (oléates) dans la veine porte augmente la pression artérielle, le rythme cardiaque, et les niveaux plasmatiques de noradrénaline et d'adrénaline. Cependant, ces infusions dans la veine porte augmentent aussi les niveaux de corticostérone, suggérant plutôt une réponse de stress face aux effets toxiques de l'oléate de sodium (Montani et al., 2002).

### **1.4.3. Rôles des changements structurels et fonctionnels dans le rein**

En plus des éléments évoqués ci-dessus, une nouvelle hypothèse a été proposée pour expliquer le développement d'une hypertension chez les personnes obèses : l'altération des forces physiques intrarénales.

En effet, chez des chiens soumis à un régime riche en matières grasses durant 5 à 6 semaines, il est déjà possible d'observer des changements histologiques au niveau de la médullaire rénale : il y a une augmentation du nombre de cellules interstitielles et de la matrice extracellulaire (Alonso-Galicia et al., 1995). En fait, l'expansion de la matrice est liée à l'accumulation d'hyaluronane dans la médullaire interne des chiens obèses (140 % d'augmentation par rapport aux chiens non soumis au régime gras).

Cependant, le contenu total en glycosaminoglycanes n'est pas significativement différent entre les chiens normaux et obèses, suggérant qu'il y a une augmentation spécifique de l'hyaluronane. Ces changements dans la matrice extracellulaire pourraient contribuer à l'altération des forces physiques intrarénales, à la compression des tubules, et à l'augmentation de réabsorption tubulaire de sodium observée chez les chiens obèses (Hall, 1997).

Selon John Hall, le rein étant entouré d'une capsule rigide de faible compliance, l'augmentation des cellules interstitielles ainsi que l'expansion de la matrice extracellulaire pourraient augmenter la pression hydrostatique interstitielle. La pression s'exerçant dans le tissu solide comprimerait alors des structures de la médullaire comme certains tubules et les vaisseaux sanguins, en particulier la partie grêle de l'anse de Henlé qui est moins rigide, et les vasa recta. Ceci entraînerait un ralentissement du flux dans l'anse de Henlé et du flux sanguin médullaire. Par conséquent, la réabsorption tubulaire de sels pourrait augmenter chez ces chiens obèses. L'augmentation de la pression artérielle serait un compromis pour maintenir le flux tubulaire et permettre une excrétion urinaire relativement normale. Mais cette théorie attend d'être étayée.

Il existe un autre point de vue : il est possible que l'augmentation de pression hydrostatique interstitielle soit due à la compression externe du pelvis rénal suite au dépôt augmenté de graisse dans l'abdomen et dans le sinus rénal. Cette compression externe pourrait bloquer les sorties urinaire, lymphatique et veineuse à tel point que la pression hydrostatique intrarénales en serait augmentée. Dans ce cas, l'augmentation des cellules interstitielles et de la matrice extracellulaire dans la médullaire pourrait être une réponse compensatoire destinée à augmenter les pressions intratubulaires et intravasculaires dans le rein, et ce afin de contrecarrer l'augmentation de pression hydrostatique interstitielle. Cette seconde hypothèse est basée sur des expériences réalisées chez des lapins obèses (Dwyer et al., 2000). Ceux-ci ont une pression artérielle d'environ 13 % plus élevée que les animaux non soumis au régime gras. Leur médullaire interne contient aussi beaucoup plus d'hyaluronane, et celui-ci est particulièrement abondant au niveau de la papille.

Il est intéressant de remarquer ici que nous avons affaire à un paradoxe. Comme signalé auparavant, une hydratation importante induit l'accumulation médullaire d'hyaluronane. Or, l'hydratation augmente non seulement l'excrétion d'eau mais aussi l'excrétion de sel. Ceci a été bien démontré chez le rat par Bankir et son équipe (Bouby et al., 1990). Pourtant, selon les hypothèses développées ci-dessus, l'obésité induirait aussi l'accumulation d'hyaluronane mais les conséquences en seraient différentes, puisqu'on observe une rétention de NaCl. Ce paradoxe reste inexplicé, c'est pourquoi les expériences réalisées sur base d'un modèle d'obésité devraient être bien contrôlées du point de vue de l'hydratation.

#### **1.4.4. Modèle d'obésité chez le rat**

En dehors du chien et du lapin, cités ci-dessus, un autre modèle animal qui convient bien à l'étude de l'hypertension liée à l'obésité est le rat. En effet, lorsque cet animal est soumis à un régime riche en graisses, il peut développer de l'hypertension, tout comme l'être humain (Dobrian et al., 2000 ; Hall et al., 2001). Pour rester encore plus proche de ce qui se passe chez l'être humain, le gain de poids peut se faire par ce qu'on appelle un « régime cafétéria ». Ce régime, décrit pour la première fois en 1979 (Rothwell and Stock, 1979), consiste à nourrir le rat avec un ensemble d'aliments que nous consommons tous les jours. Ainsi, on trouve dans ce régime du fromage, du saucisson, du jambon, des biscuits, des gâteaux, du pop corn, etc. Les rats sont bien souvent aussi friands que nous de ces nourritures. Ils prennent donc du poids d'une façon qui se rapproche de la nôtre, en consommant des aliments gras et souvent riches en sel.

Le régime cafétéria chez le rat a déjà fait ses preuves dans l'étude de diverses manifestations de l'obésité telles que l'hyperplasie des adipocytes (Mandenoff et al., 1982), la sécrétion de l'hormone de croissance (Zhou et al., 1998), et l'altération des sous-types de récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques dans le rein chez des rats rendus hypertendus par ce régime (Coatmellec-Taglioni et al., 2000).

## 2. Matériel et méthodes

### 1.5. Buts du

### travail

- 1- Mise au point d'un modèle d'obésité basé sur l'apport d'aliments de cafétéria chez le rat. Afin d'étudier ce modèle, les quantités d'eau et d'aliments ingurgitées (apports énergétiques, sodés et hydriques journaliers) sont minutieusement suivies.
- 2- Suivi de l'évolution de ce modèle au cours du temps, en particulier en terme des variations éventuelles de la pression artérielle. L'un des buts de ce mémoire est de mettre en évidence un effet du régime alimentaire de type cafétéria sur la pression artérielle des animaux. Pour cela, les pressions artérielles moyennes (PAM) sont mesurées à 3, 6, 9 et 11 semaines.
- 3- Etude de l'accumulation et de la répartition de l'hyaluronane dans le rein de ces animaux. John Hall et son équipe postulent que l'obésité entraînerait l'hypertension suite à des modifications rénales et en particulier suite à l'accumulation médullaire d'hyaluronane. Cette partie du travail vise donc à apporter des éléments supplémentaires pour juger du bien-fondé de cette hypothèse.
- 4- Etude de la répartition rénale du récepteur CD44 à l'hyaluronane dans le rein de ces animaux. Si l'hyaluronane s'accumule dans le rein des individus obèses, qu'en est-il pour son récepteur CD44 ? L'accumulation rénale du CD44 a déjà été démontrée dans diverses pathologies mais pas dans le cas de l'hypertension liée à l'obésité.
- 5- Mise au point d'une technique de dosage de l'hyaluronane. Suite à l'arrêt de la vente du kit commercial de dosage de l'hyaluronane en Europe (HA-test de Pharmacia) deux solutions ont été envisagées : soit se tourner vers l'achat d'un kit équivalent vendu au Japon par la firme Chugai Pharmaceutical (mais la disponibilité de ce kit est aléatoire et son transport coûteux), soit mettre au point, au laboratoire, une méthode de dosage de l'hyaluronane pour suppléer au kit. Cette deuxième solution a été préférée.

## ***2.1. Paramètres physiologiques***

---

### **2.1.1. Mesure de la pression artérielle moyenne (PAM)**

#### **Principe**

La pression artérielle est mesurée par un système comprenant un cathéter (introduit dans l'artère fémorale), un transducteur P23ID (Gould – Statham), et un électromanomètre (Hugo Sachs Electronik). L'onde de pression venant du cathéter est transmise au transducteur via une solution d'héparine. Le transducteur comprend un circuit de résistances agencées selon le principe du « pont de Wheastone ». Tout déséquilibre de résistance dans ce circuit est traduit en une réponse électrique proportionnelle à ce déséquilibre. Enfin, ce courant électrique est converti en millimètres de mercure par l'électromanomètre.

#### **Opération**

Après anesthésie du rat par injection intrapéritonéale de pentobarbital (Nembutal : 0,01 ml par 100g de poids corporel), l'artère fémorale est isolée et cathérisée. Le cathéter est alors relié au transducteur via un des robinets et la PAM est mesurée selon le principe décrit ci-dessus.

### **2.1.2. Prélèvement des reins et du sang**

Les reins de l'animal sont prélevés après ligature de l'artère et de la veine afin d'éviter les pertes sanguines. Le rein droit est congelé dans de l'azote liquide et le rein gauche est fixé dans du Bouin alcool.

Des coupes histologiques seront ensuite réalisées à partir du rein fixé dans le Bouin, pour réaliser les marquages immunohistochimiques du CD44 et de l'hyaluronane qui seront décrits plus loin. Enfin, le sang est prélevé au niveau de l'aorte au moyen d'une seringue en verre héparinée, et transvasé dans un tube à EDTA (Ethylene diamine tetraacetic acid). Celui-ci est centrifugé à 2500 rpm (860×g) pendant 20 minutes pour ensuite récupérer le plasma.

### **2.1.3. Mesure de l'hématocrite (Hct)**

- Le sang est prélevé dans deux microcapillaires héparinés de 60 µl au moyen du cathéter introduit dans l'artère fémorale.
- Une des extrémités des capillaires est bouchée à l'aide de plasticine.
- Les deux tubes sont centrifugés cinq minutes à 1500 rpm pour séparer la phase plasmatique de la phase cellulaire.
- L'hématocrite (volume des globules rouges / volume sanguin total) est obtenue en mesurant la hauteur de la phase cellulaire.

#### 2.1.4. Urée plasmatique

**Principe :** le dosage est basé sur une réaction colorimétrique entre l'urée et la diacétylmonoxime émettant un maximum d'absorbance à une longueur d'onde de 535 nm. Le dosage est facilement réalisé grâce à l'utilisation d'un kit commercialisé (BUN test, Sigma kit, No 535). Après réaction entre l'urée des échantillons (ou des standards) et la diacétylmonoxime, la densité optique est mesurée au spectrophotomètre (Bausch & Lomb, Spectronic 21, Milton Roy, Spectronic GENESIS 5) à la longueur d'onde de 535 nm. La concentration en urée est déterminée sur base d'une courbe d'étalonnage établie à partir de solutions standard d'urée.

#### 2.1.5. Créatinine plasmatique

**Principe :** le dosage est basé sur la formation d'un complexe coloré entre la créatinine et le picrate alcalin émettant un maximum d'absorbance à 490 nm. Un kit commercialisé permet de réaliser facilement ce dosage (Sigma, No 555-A). Après réaction entre la créatinine et le picrate alcalin, les densités optiques sont mesurées (20 secondes et 80 secondes après le mélange). Une formule simple permet ensuite de déterminer la concentration en créatinine en se basant sur une solution étalon de concentration connue en créatinine.

#### 2.1.6. Osmolalité plasmatique

Celle-ci est déterminée par un osmomètre cryoscopique (ONE-TEN, FISKE ASSOCIATES).

**Principe :** l'échantillon est rapidement refroidi dans l'appareil et sa cristallisation est induite par une impulsion mécanique. Il est ensuite réchauffé jusqu'à atteindre une température proche du point de fusion où il atteint l'équilibre glace – eau. Le point cryoscopique est alors mesuré avec une précision de 0,002°C. Celui-ci étant directement fonction de la concentration en soluté du solvant, l'osmolalité peut être déterminée (mOsm/kg).

#### 2.1.7. Sodium et potassium urinaires

Les concentrations urinaires en sodium et en potassium sont mesurées par spectrophotométrie à émission de flamme (IL943, Instrumentation Laboratory).

## 2.2. Marquages immunohistochimiques

---

### **2.2.1. Marquage immunohistochimique du récepteur CD44 dans le rein de rat**

#### **Préparation des coupes histologiques**

Les reins gauches de chaque rat sont prélevés avant la mort de l'animal et fixés dans le liquide de Duboscq-Brazil (Bouin alcool). Après 48 heures, ils sont plongés dans plusieurs bains d'alcool à 95° et de butanol, avant d'être enrobés à la paraffine.

Des coupes fines (5 µm d'épaisseur) sont obtenues à partir de ces blocs de tissu sur un microtome Reichert Autocut 2040.

Ces coupes sont étalées sur des lames porte-objet préalablement traitées au silane (3-Aminopropyltriethoxy-silane, 98%, Sigma) afin d'assurer une bonne adhésion du tissu sur le support en verre.

Les lames sont ensuite séchées à 40°C pendant 24 heures, avant d'être stockées à l'abri de la lumière jusqu'à leur utilisation.

#### **Méthode immunohistochimique**

##### Principe

La technique immunohistochimique de marquage du CD44 utilise divers réactifs de façon successive : l'anticorps primaire reconnaît le CD44 ; il est ensuite reconnu par un anticorps secondaire biotinylé qui fixe à son tour un réactif ABC (Avidine-Biotine-Complex) contenant de la peroxydase. Cette dernière permet l'oxydation et la précipitation d'un colorant (diaminobenzidine ou DAB) en présence d'eau oxygénée (**Fig. 2.1**).

##### Méthode

#### **1- Prétraitements**

Les coupes sont déparaffinées au toluène et rincées par des bains d'alcool à 95°C. L'alcool est lui-même éliminé en plongeant les lames 10 minutes dans l'eau courante.

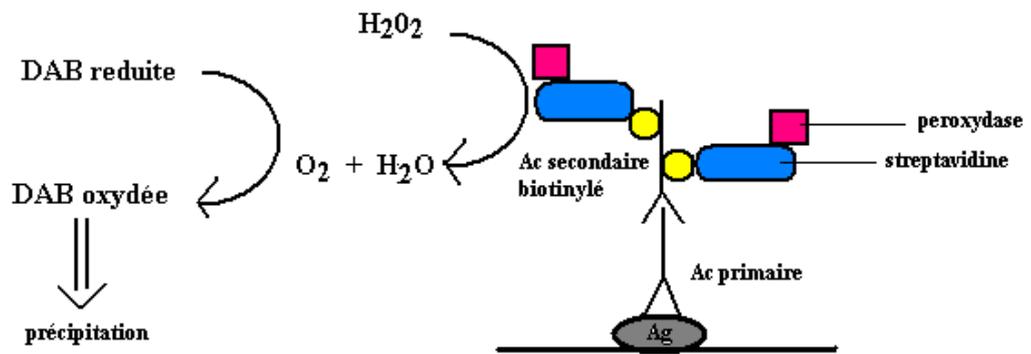
##### *Démasquage*

La fixation des tissus dénature les protéines et modifie leur conformation, ce qui rend les épitopes relativement peu accessibles aux anticorps. Il est donc nécessaire de prétraiter les coupes 10 minutes au four à micro-ondes, dans un tampon citrate (0,01 M, pH = 6) afin de retrouver, au moins partiellement, l'accessibilité des épitopes.

Après cette étape de démasquage, les lames sont ramenées lentement à température ambiante.

##### *Traitement par une solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*

Les peroxydases endogènes pourraient interagir avec la DAB (voir l'étape de révélation).



**Fig. 2.1** Méthode ABC d'amplification du signal.

Pour éviter cela, les lames sont plongées dans un bain d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,06%) pendant 5 minutes. Elles sont ensuite rincées à l'eau distillée et placées dans du PBS (0,04 M NaHPO<sub>4</sub>, ; 0,01 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 0,12 M NaCl ; pH = 7,4).

#### *Traitement à l'avidine*

Cette étape permet d'inhiber la biotine endogène contenue dans les tissus. Les coupes sont traitées avec une solution d'avidine (Vector Laboratories, Inc.) pendant 5 à 10 minutes puis rincées 3 x 5 minutes du PBS.

#### *Traitement à la biotine*

L'avidine possède plusieurs sites actifs qu'il est nécessaire de saturer par la biotine. Les coupes sont traitées à la biotine (Vector Laboratories, Inc.) pendant 5 à 10 minutes et ensuite rincées 3 x 5 minutes dans le PBS.

#### *Traitement par une solution de caséine*

Ceci a pour effet d'éliminer les sites de fixation aspécifiques des protéines. Les coupes sont traitées par une solution de caséine à 0,5 % dans du PBS pendant 15 minutes.

## **2- Immunohistochimie**

#### *Incubation avec l'anticorps primaire*

Les coupes sont incubées avec l'anticorps anti-CD44 (Purified anti-rat CD44H, OX-49, PharMingen), dilué 50 x dans la solution de caséine 0,5%, pendant une heure à température ambiante. L'incubation se fait en chambre humide afin d'éviter toute déshydratation du tissu. Les lames sont ensuite rincées 3 x 5 minutes dans le PBS.

#### *Incubation avec l'anticorps secondaire*

L'anticorps secondaire utilisé est un anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris biotinylé (Dako), dilué 50 x dans la solution de caséine. Les coupes sont incubées 30 minutes avec cet anticorps, en chambre humide et à température ambiante, puis elles sont rincées 3 x 5 minutes dans le PBS.

#### *Incubation avec le complexe avidine-biotine-peroxydase (ABC)*

Les coupes sont incubées avec le complexe ABC (Dako) pendant au moins 30 minutes. Elles sont ensuite rincées 3 x 5 minutes dans le PBS.

#### *Révélation*

La présence de peroxydase est visualisée au moyen d'une solution de DAB (ou 3,3' Diaminobenzidine, Sigma) 0,05 % dans du PBS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 2%. La DAB oxydée est un composé insoluble brun-noir qui précipite.

Cette réaction, d'intensité croissante, est observée sous le microscope et stoppée par immersion dans l'eau distillée dès que le contraste est optimum. Le temps de révélation optimal, pour le marquage du CD44, est de 5 à 6 minutes.

Les coupes sont ensuite rincées à l'eau distillée, contre-colorées au bleu luxol (0,1%), déshydratées par passages successifs dans des bains d'alcool à 95°, de butanol et de toluène, et montées au baume synthétique.

### **2.2.2. Détection immunohistochimique de l'hyaluronane dans le rein de rat**

L'hyaluronane est mis en évidence dans le rein grâce à une protéine biotinylée : l'HABP (hyaluronan-binding protein biotinylée, Sigma). La méthode d'amplification à la TSA, Tyramine Signal Amplification (Perkin Elmer, Life Sciences, Inc.), est utilisée afin de visualiser l'hyaluronane sur les coupes.

Cette méthode repose sur le principe suivant (**Fig. 1.2**) : le signal est amplifié par l'oxydation d'un composé, la tyramine biotinylée, qui est alors capable de former des liens covalents avec les protéines avoisinantes. Le système d'amplification occupe alors une plus grande surface autour de la molécule que l'on souhaite visualiser, ce qui permet une amplification considérable lors de la révélation.

Les étapes de démasquage, de traitement à l' $H_2O_2$ , à l'avidine, à la biotine et à la caséine sont réalisées de façon identique à celles décrites pour le CD44.

#### *Incubation avec l'HABP*

Les lames sont traitées pendant une heure à l'HABP diluée 200 x dans du PBS (1,25  $\mu$ g/ml), en chambre humide. Elles sont ensuite rincées 3 x 5 minutes dans du PBS.

#### *Incubation avec la streptavidine peroxydase*

Les lames sont incubées 15 minutes avec la streptavidine-peroxydase (fournie dans le kit de TSA de Perkin Elmer) en chambre humide, puis rincées 3 x 5 minutes dans le PBS.

#### *Incubation avec tyramine biotinylée*

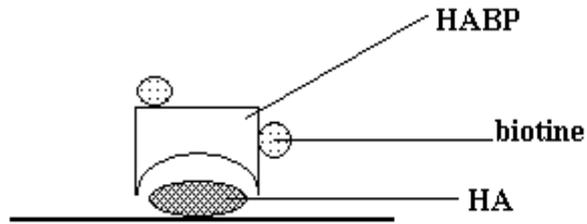
Les lames sont traitées 10 minutes à la tyramine biotinylée en chambre humide, puis rincées 3 x 5 minutes dans le PBS.

#### *Incubation avec la streptavidine peroxydase*

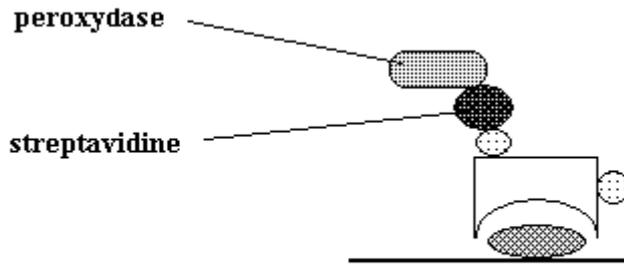
Les lames sont à nouveau traitées à la streptavidine peroxydase, 30 minutes en chambre humide. Elles sont ensuite rincées 3 x 5 minutes dans le PBS.

#### *Révélation*

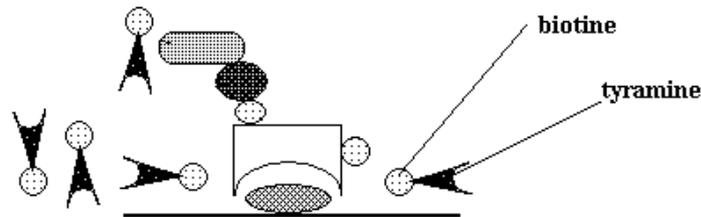
Les coupes sont révélées à la DAB comme pour le CD44, colorées au bleu Luxol (0,1%), déshydratées et montées au baume synthétique.



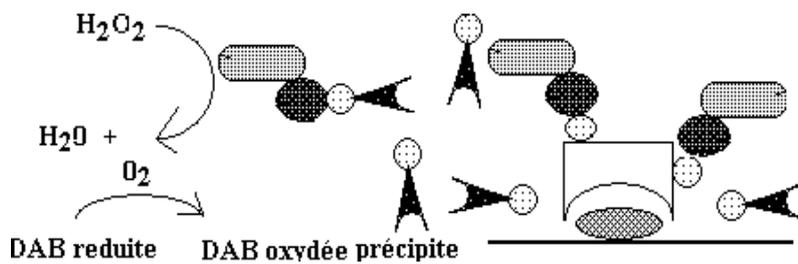
**A : L'HABP (hyaluronan-binding protein) – biotinylée reconnaît l'hyaluronane de la coupe.**



**B : La streptavidine-peroxydase se fixe sur la biotine de l'HABP.**



**C : La streptavidine-peroxydase catalyse le dépôt des molécules de Tyramine biotinylées à proximité du site de reconnaissance.**



**D : La streptavidine-peroxydase ajoutée en dernier lieu se fixe sur les molécules de biotine libres et catalyse l'oxydation du colorant qui précipite.**

**Fig. 2.2** Méthode TSA d'amplification du signal

### **2.2.3. Evaluation de l'intensité du marquage**

L'intensité du marquage, que ce soit celui du CD44 ou de l'hyaluronane, est estimé par une échelle semiquantitative déterminée par deux examinateurs différents.

0	absence de marquage
+	léger marquage
++	marquage intense,
+++	marquage très intense

## ***2.3. Techniques relatives aux protéines***

---

### **2.3.1. Dosage des protéines**

La concentration en protéines d'extraits tissulaires de rein, d'extraits de cartilage (voir la mise au point d'une technique de dosage de l'hyaluronane), et d'échantillons urinaires, est déterminée par la technique décrite initialement par Bradford (Bradford, 1976), au moyen du kit BIO-RAD (BIO-RAD protein assay).

### **2.3.2. Analyse des protéines par Western blot**

Afin de visualiser la distribution et la taille du CD44 au sein des différentes zones du rein, des homogénats de cortex, de médullaire externe et de médullaire interne ont été déposés sur gel. Le CD44 a ensuite été détecté par western blot, en utilisant l'anticorps monoclonal anti-rat CD44H OX-49 (PharMingen).

#### **Principe du western blot :**

Les protéines d'extraits tissulaires de rein sont séparées par migration électrophorétique (SDS-PAGE). Les bandes de protéines sont ensuite transférées sur une membrane PVDF (NEN) par application d'un champ électrique. La membrane est alors bloquée puis incubée avec une solution contenant l'anticorps spécifique anti-CD44 (dilué 500 x), puis avec une solution contenant un anticorps secondaire anti-souris couplé à la peroxydase de raifort (dilué 2000 x). Pour visualiser la protéine, il suffit d'amener de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et du luminol qui sont fournis dans le kit de chemiluminescence « ECL Plus » (NEN) et de détecter le signal sur un film autoradiographique.

## ***2.4. Techniques relatives à l'hyaluronane***

---

### **2.4.1. Dosage de l'acide uronique**

Ce dosage permet d'obtenir une très bonne approximation de la concentration en acide glucuronique, qui entre dans la composition de l'hyaluronane.

**Principe :** réaction colorimétrique entre l'acide glucuronique et un composé organique, le carbazole, après traitement de l'échantillon à l'acide sulfurique et en présence d'ions borates. Cette réaction présente un maximum d'absorbance à 530 nm.

Le protocole de dosage suivi est celui de Bitter et Muir (1962) qui ont légèrement modifié la technique mise au point par Dische (1947).

### **2.4.2. Dosage de l'hyaluronane**

Les médullaires internes des animaux ont été isolées, lyophilisées (LYOVAC GT 2, LETBOLD-HERAEUS) et traitées à la pronase (Sigma, 4,3 Unités/mg de tissu), afin de pouvoir doser l'hyaluronane. Il a été possible d'obtenir un des derniers kits de dosage de l'hyaluronane encore vendu en Europe (HA test, Pharmacia) pour réaliser ces mesures.

#### **Principe :**

Cette technique de dosage de l'hyaluronane se base sur l'utilisation d'HABP radiomarquée (HABPI\*) et d'une résine de sépharose couplée à de l'hyaluronane. Le principe est le suivant : l'échantillon à doser (ou une solution standard d'HA) est mélangé à une quantité déterminée de HABPI\* et à de la résine couplée à de l'HA. Les HABPI\* peuvent donc se fixer soit sur l'HA de l'échantillon, soit sur l'HA de la résine. Après centrifugation du mélange, la résine, ainsi que les HABPI\* qui s'y seront liées, précipiteront, laissant l'HA de l'échantillon lié à de l'HABPI\* dans le surnageant. Le comptage des coups dans le culot permettra de déterminer la quantité de HABPI\* fixée à la résine et à l'HA de l'échantillon. Après réalisation d'une droite d'étalonnage sur base de différentes solutions standard d'HA, il sera possible de déterminer la quantité d'HA présente dans un tissu. Cette technique découverte en 1979 (Tengblad, 1979 ; Laurent and Tengblad, 1980) a déjà été améliorée par de nombreuses équipes (Armstrong and Bell, 2002).

### 2.4.3. Mise au point d'une technique de dosage de l'hyaluronane

La vente du kit de dosage ayant été stoppée il y a déjà quelques mois, il est nécessaire de mettre au point une autre technique de quantification de l'hyaluronane.

Le principe de la technique de dosage est exactement le même que celui du kit commercial de Pharmacia (voir plus haut). Pour réaliser le dosage, il est donc nécessaire d'avoir : des HABP marquées, une résine couplée à de l'hyaluronane, et des solutions standard d'hyaluronane.

- **Purification des HABP**

#### *Extraction des protéoglycanes du cartilage*

Les HABP sont présentes en grande quantité dans les tissus cartilagineux ; c'est pourquoi nous sommes partis de cartilage trachéal de bœuf (Sigma). L'extraction des protéoglycanes de ce cartilage (25 g) se fait à la guanidine HCl 4M dans un tampon acétate 0,5M, pH = 5,8, pendant 30 heures à 4°C et sous agitation constante. La guanidine HCl 4M a la propriété de dissocier les agrégats de protéoglycanes tels que les associations d'agrécan, d'hyaluronane et de protéines de liaison (voir chapitre sur les HABP dans l'introduction).

L'extrait obtenu est centrifugé 30 minutes à 2500 rpm (860xg) afin de récupérer la phase liquide contenant maintenant les protéoglycanes, cette dernière est alors dialysée contre de l'eau pour enlever la guanidine HCl.

Le dialysat est ensuite récupéré et lyophilisé (Lyovac GT 2, LEYBOLD-HERAEUS).

Un échantillon de ce lyophilisat, 3,2 g, est mélangé à 90 ml d'acétate de sodium 0,1M, Tris-HCl 0,1M, pH = 7,4, sous agitation toute la nuit à 4°C.

Le lendemain, 7 mg de trypsine (Sigma, 14100 unités/mg de protéines) sont ajoutés à la solution afin de solubiliser entièrement l'extrait de cartilage. La solution est placée 4 heures à 37°C, sous agitation continue. La digestion est arrêtée d'une part par l'addition de 9,2 mg d'inhibiteur de trypsine et d'autre part par un changement de température (la solution est placée en chambre froide). Le traitement à la trypsine permet de libérer les domaines G1 et G2 de l'agrécan, appelés hyaluronan-binding region (HABR) et la protéine de liaison du cartilage (Baker and Caterson, 1979 ; Neame and Barry ; 1994, Watanabe, 1998), c'est-à-dire des HABP.

La solution obtenue est alors dialysée, d'abord contre de l'eau, puis contre du tampon acétate 0,5 M, pH = 5,8.

#### *Préparation de la résine couplée à l'hyaluronane*

La résine de sépharose sur laquelle on fixe de l'HA a deux rôles : premièrement, elle permet d'isoler des HABP ; deuxièmement, elle permet la réalisation du dosage d'hyaluronane.

Le couplage de l'HA sur la résine se fait en une étape en présence de l'agent couplant, l'EDAC (1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide) à pH acide. D'un point de vue pratique, 50 ml de résine EAH sépharose 4B (Amersham Biosciences), initialement dans l'éthanol, sont lavés par centrifugation avec de l'eau bidistillée.

Ensuite, l' HA à fixer sur cette résine (en solution de 10 mg/ml, de 400.000 et de 790.000 Da) est amené à un pH acide d'environ 4,5 avec de l'HCl 2N.

L'EDAC (1,4 g) est solubilisé dans 15 ml d'eau bidistillée amenée à un pH = 4,5.

Les trois éléments peuvent alors être mélangés, l'EDAC étant ajouté goutte à goutte. La mixture est ensuite agitée pendant 24 heures, sur roue, à 4°C. Il est important que le pH soit maintenu à 4,5 – 5,0 pour que la liaison ait lieu.

Après ces 24 heures, le mélange est lavé successivement avec du NaCl 1M, du Tris-HCl 0,1M pH = 8,1, du tampon formate 0,05M pH = 3,1, et enfin de l'acétate de sodium 0,5 M pH = 5,8, par centrifugation, 10 minutes à 2000 rpm (800×g).

Le sépharose couplé à l'hyaluronane est stocké dans le tampon acétate à 4°C.

Tous les surnageants des lavages sont conservés afin de pouvoir estimer ultérieurement la quantité d'HA fixée sur la résine.

### ***Préparation de la colonne d'affinité***

Les HABP sont isolées sur une colonne d'affinité dont la résine couplée à l'HA constitue l'appât.

La colonne de type XK 26 (Amersham Biosciences) est connectée à un système de refroidissement (bain-marie à 12°C HAAKE C).

Le débit de passage sur la colonne doit être de 0,5 ml/min, et des fractions de 4 ml sont recueillies.

### ***Isolement des HABP par colonne d'affinité***

L'extrait de cartilage (voir point A) est mélangé (en bouteille) avec la résine couplée à l'HA, sous agitation lente. Le mélange se fait dans un milieu de guanidine HCl 0,4M qui favorise la liaison entre l'HABP et l'HA, pendant 16 heures, à 4°C.

Après cette étape, la colonne peut être « packée » avec le mélange.

Afin d'enlever tout ce qui n'est pas retenu de façon spécifique à l'HA de la résine, celle-ci est lavée par 100 ml de NaCl 1M, puis par un gradient linéaire de NaCl de 1 à 3 M (6 heures à un débit de 2 ml/min).

Pour éluer les HABP retenues sur la résine, 400 ml de guanidine HCl 4M dans un tampon acétate 0,5M, pH = 5,8 sont passés sur la colonne, à un débit de 0,5 ml/min.

Les densités optiques des fractions éluées sont mesurées à une absorbance de 280 nm. Les fractions enrichies en protéines (HABP) sont ensuite dialysées contre de l'eau.

Avant toute nouvelle utilisation, la résine doit être régénérée. Pour cela, elle est d'abord lavée au Tris-HCl 0,2M, pH = 8,0, puis traitée à la Pronase (Sigma) à une concentration finale de 1 mg/ml, pendant toute une nuit à 4°C. Elle est ensuite lavée par 100 ml de NaCl 0,5M, puis par 300 ml de guanidine HCl 4M, et enfin par 200 ml de tampon acétate 0,5M, pH = 5,8. C'est dans ce dernier tampon que la résine est stockée, à 4°C, en vue d'une future utilisation.

- **Iodination des HABP**

Les HABP doivent être marquées radioactivement pour permettre le dosage de l'HA. Ainsi, les fractions contenant les HABP sont marquées à l' $^{125}\text{I}$  en utilisant un tube tapissé d'un réactif d'iodination, l'iodo-Gen ou 1,3,4,6-tetrachloro-3a-6a-diphénylglycouril (iodo-Gen Pre-coated iodination tubes, PIERCE). Cette technique impose deux contraintes principales : premièrement, la quantité de protéines à iodiner doit être de 0,3 à 1 nmol/100 $\mu\text{l}$  et, deuxièmement, la quantité d'iode à utiliser doit rester dans les proportions de 500  $\mu\text{Ci}$  pour 100  $\mu\text{g}$  de protéines.

L'échantillon d'HABP est donc concentré pour obtenir la bonne concentration de protéines avant de subir la réaction d'iodination. Celle-ci se passe dans le tube à IODO-Gen dans lequel l'échantillon (225  $\mu\text{g}$  de protéine/200 $\mu\text{l}$ ), l' $^{125}\text{I}$  (1mCi), et du tampon phosphate 0,125M, pH = 7,4 (100 $\mu\text{l}$ ) ont été introduits. Après 15 minutes de mélange à froid, la réaction est arrêtée par l'ajout de KI 1mM au final. Le produit de la réaction est alors dialysé une première fois contre du tampon phosphate 0,125mM, KI 0,1 mM, pH = 7,4, et ensuite contre ce même tampon mais sans KI.

## ***2.5.Méthodes statistiques***

---

Différents tests statistiques ont été utilisés au cours de ce travail, afin d'étudier la validité de nos résultats. Ainsi, les tests d'analyse de la variance à un et deux critères de classification (ANOVA-1 et ANOVA-2), les tests-t non pairés, et le post-test de Bonferroni ont été utilisés dans la partie « Résultats » de ce mémoire. Ces analyses ont été réalisées avec l'aide du programme informatique Prism-3 (GraphPad). Une valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme significative.

## 3. Résultats

### *3.1. Mise au point d'un modèle d'obésité chez le rat*

---

Le régime alimentaire choisi pour mettre au point le modèle d'obésité fut décrit et testé pour la première fois en 1979 (Rothwell and Stock, 1979). Depuis lors, ce régime surnommé régime de « cafétéria » a été utilisé dans de nombreuses études afin d'observer diverses manifestations physiologiques liées à l'obésité, en particulier le développement d'une hypertension chez le rat Sprague-Dawley mâle (Coatmellec-Taglioni et al., 2000 ; Hall et al., 2001). Un autre avantage de ce régime est qu'il s'apparente très fort aux excès alimentaires constatés chez l'homme occidental.

#### **3.1.1. Les rats et leurs régimes alimentaires**

Un total de 104 rats Sprague-Dawley mâles d'environ 140 g âgés de 4 à 5 semaines ont été répartis en 2 groupes : d'une part ceux soumis à un régime normal et, d'autre part, ceux soumis à un régime hypercalorique riche en matières grasses. Une autre subdivision a été réalisée en soumettant les rats à deux niveaux d'hydratation différents. Ainsi, l'alimentation et l'apport hydrique déterminent 4 régimes : le régime normal avec hydratation élevée (NH), le régime normal avec hydratation limitée (NL), le régime gras avec hydratation élevée (GH) et le régime gras avec hydratation limitée (GL).

Les mesures physiologiques ont été réalisées à 3, 6, 9 et 11 semaines de régime.

#### **Le régime normal avec hydratation élevée (NH)**

Les rats soumis à ce régime reçoivent une quantité précise et limitée de croquettes (UAR, Rats-Souris entretien A04) allant de 13 à 21 g, en fonction de l'âge de l'animal. La composition et la valeur énergétique de ces croquettes sont reprises dans le **Tableau 3.1**. Les croquettes sont broyées et mélangées à de l'eau et de l'agar dans les proportions suivantes : 19,9 % de croquettes, 79,5 % d'eau bouillante et 0,6 % d'agar. Après refroidissement, ce « gâteau hydraté » est donné aux rats qui bénéficient aussi d'une provision d'eau de boisson en excès de sorte qu'ils ingurgitent un maximum d'eau. En dehors de gavages intragastriques journaliers, la technique du « gâteau hydraté » est la meilleure façon de maintenir des rats en état d'hydratation élevée pendant de longues périodes (Bouby et al., 1990). Les quantités d'eau et d'aliments consommées par jour sont mesurées précisément pour chaque rat.

#### **Le régime normal avec hydratation limitée (NL)**

Les rats reçoivent une quantité précise de croquettes identique à celle donnée aux NH, mais sans addition d'eau cette fois. De plus, leur eau de boisson est limitée de façon à contrôler strictement l'apport hydrique.

**Tableau 3.1 :** Compositions et valeurs énergétiques des aliments de cafétéria utilisés (pour 100 g)

	Lipides (g)	HC (g)	Protéines (g)	eau (ml)	Na (mg)	kcal
Salami	22	1	23	51	1800	306
Marshmallow	21	58	5	25	250	45
Jambon	6	2	18	74	1800	14
Fromage	48	1	30	48	1800	57
Lard sucré	14	49	4	33	250	347
Barre caramel	20	67	3.5	9	250	475
Barre chocolatée	27	61	7	5	250	531
Biscuits apéritifs	26	61	6	7	1800	518
Saucisson	19	7	11	63	900	25
Lardons	30	1	14	55	1400	34
Popcorn	4	29	15	52	0	22
Melo Cake™	20	60	4	16	250	45
Croquettes	2.7	47.3	16	12.3	250	284

HC = Hydrates de carbone

### **Le régime normal avec hydratation très limitée (NTL)**

Ce troisième type de régime alimentaire se distingue du régime NL par le fait que les animaux de ce groupe, les premiers arrivés, ont été très limités en eau pendant les trois premières semaines de régime. Il est possible que cette limitation ait été un peu trop stricte, car il est apparu progressivement que les animaux NTL (et GTL, cf. ci-après) avaient une croissance plus lente durant les premières semaines. Dès lors, la quantité d'eau de boisson a été ajustée pour les groupes suivants. A posteriori, il s'est avéré que les rats NTL et GTL ne présentaient pas de signes de déshydratation majeurs (cf. plus loin).

### **Le régime gras avec hydratation élevée (GH)**

Les rats sont soumis à ce qu'on appelle un « régime cafétéria », c'est-à-dire qu'en plus du gâteau hydraté et de l'eau de boisson non limitée, ils reçoivent, chaque jour, 3 aliments de type « cafétéria » à volonté. Les trois aliments sont alternés quotidiennement avec d'autres au cours de la semaine, et leur consommation est rigoureusement pesée chaque jour. La liste complète de ces aliments ainsi que leurs compositions nutritives sont reprises au **Tableau 3.1**.

### **Le régime gras avec hydratation limitée (GL)**

Les rats reçoivent des croquettes et les trois aliments de cafétéria quotidiens, mais leur eau de boisson est limitée.

### **Le régime gras avec hydratation très limitée (GTL)**

Tout comme les NL, les premiers GL ont été plus limités en eau au cours des trois premières semaines. Ils furent donc aussi placés dans un groupe à part, afin d'assurer l'homogénéité des groupes.

#### **3.1.2. Apports énergétiques**

Comme le montre la **Fig. 3.1**, les animaux soumis au régime cafétéria (GH, GL et GTL) ont un apport calorique nettement plus important que les animaux ne recevant que des croquettes (NH, NL et NTL). Environ 10 % des apports caloriques journaliers des animaux soumis à un régime normal sont dus aux lipides, tandis que chez les rats soumis au régime cafétéria, les lipides représentent 30 %.

Il existe des différences d'apports caloriques significatives entre les groupes ( $p < 0,0001$ ), principalement entre les « N » et les « G » mais aussi parfois au sein d'un même groupe, entre les animaux soumis à des niveaux d'hydratation différents. Ainsi, les rats NH et NL consomment de 2 à 4 Kcal par jour en plus que les rats NTL. Néanmoins, les différences entre « H / L » et « TL » ne sont pas très importantes, comme le confirme le post-test statistique de Bonferroni ( $p$  toujours  $> 0,05$ ).

Dans le groupe « G », les rats GH et GL consomment de 100 à 120 Kcal par jour, avec une pointe à 130 Kcal/jour pour les GH durant les 3 premières semaines, alors que les rats GTL ont consommés respectivement 70, 80 et 100 Kcal/jour au cours des 3 périodes.

## Apports énergétiques

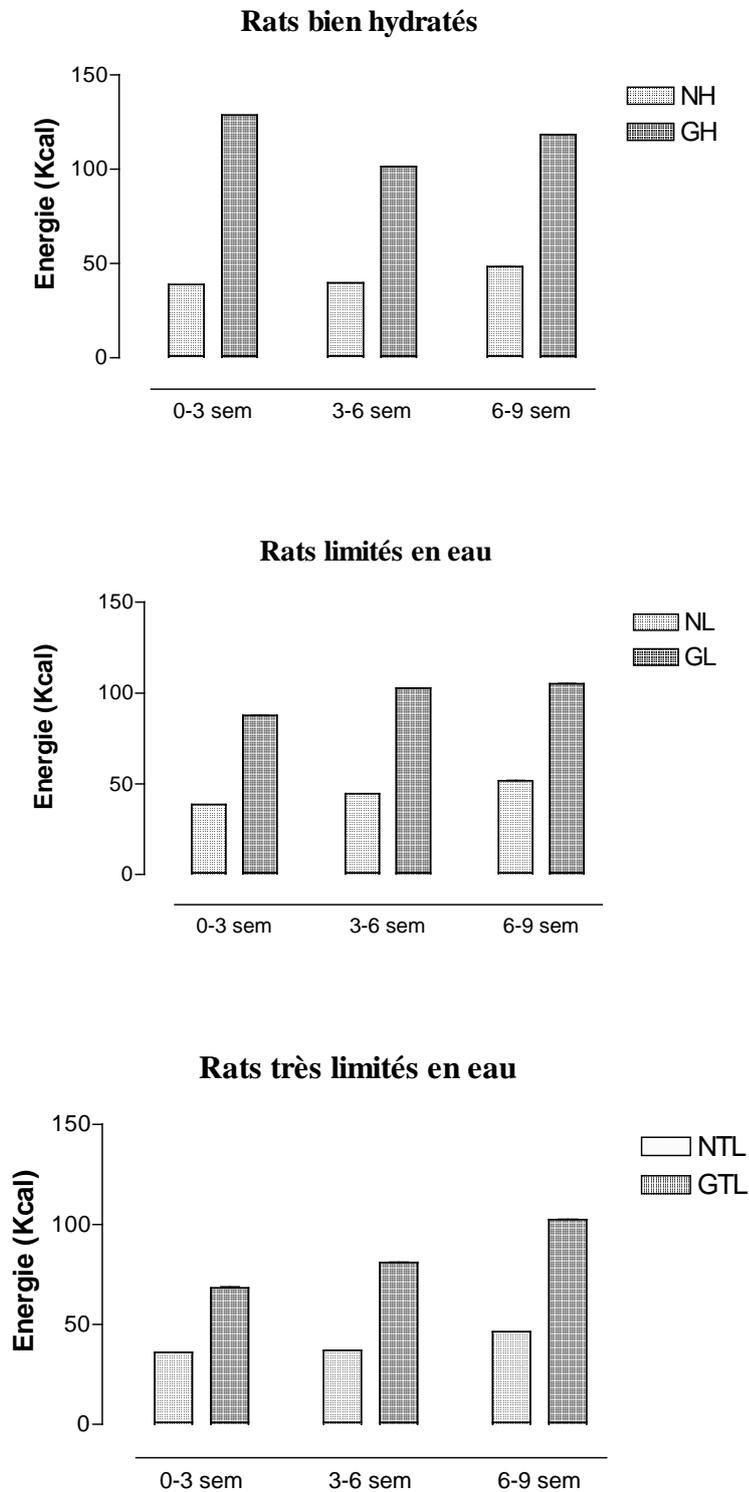


Fig. 3.1 : Comparaison au cours du temps des apports énergétiques moyens des rats soumis à un régime normal (N) ou à un régime hypercalorique (G) au sein des différents groupes d'hydratation. Les ESM sont indiqués, mais à peine visibles.

Le post-test de Bonferroni montre une différence significative entre les apports caloriques des GH et des GTL mais pas entre ceux des GL et des GTL.

En résumé, tous les rats soumis à un régime limité en eau consomment un peu moins d'énergie que leurs congénères soumis au régime très hydraté. Cela n'est pas étonnant car il a déjà été montré qu'une restriction hydrique chez le rat limite l'apport alimentaire (par exemple, par Schoorlemmer and Evered, 2002).

On remarque aussi que la quantité de calories apportées par les aliments augmente progressivement au cours du temps et selon le niveau d'hydratation (sauf pour les rats GH qui ont consommé plus de calories durant les trois premières semaines de régime). Les animaux grandissant de jour en jour, il ne fait aucun doute que la masse de nourriture mangée varie de façon parallèle. Le test statistique de type ANOVA-2 confirme qu'il y a un effet du temps sur l'apport calorique ( $p < 0,0001$ ). Le niveau d'hydratation influence aussi l'apport calorique de façon positive ( $p < 0,0001$ ), que ce soit chez les animaux soumis au régime normal ou gras.

### 3.1.3. Apports hydriques et sodés

La **Fig. 3.2** présente les consommations journalières moyennes d'eau et de sodium des différents groupes de rats, en tenant compte, pour l'eau, du gâteau hydratant, de l'eau des aliments et de l'eau de boisson. Les résultats sont groupés par périodes de 3 semaines.

Les NH et les GH ingurgitent de 70 à 100 ml d'eau par jour dont la majeure partie se trouve dans le gâteau hydratant. Les NTL et GTL ont environ la même consommation d'eau que les NL et GL entre la sixième et la neuvième semaine (environ 20 ml/jour) mais avant cela, la quantité d'eau bue chaque jour est un peu plus faible. Dans tous les cas, les animaux soumis à un régime gras consomment de 3 à 15 ml d'eau en plus que ceux soumis à un régime normal. Ceci s'explique en partie par l'eau qui se trouve dans les aliments de cafétéria (4 à 8 ml d'eau/jour) et, chez les animaux libres de boire à volonté (GH), aussi par l'effet du sel contenu dans les aliments, effet qui augmente probablement la soif.

La consommation journalière moyenne de sodium a été calculée rat par rat, en tenant compte des différents apports alimentaires. Il est visible sur la **Fig. 3.2** que la consommation journalière de sel, tout comme celle d'eau et de calories, augmente légèrement au cours du temps dans tous les groupes. Ceci est à mettre en rapport avec la prise de poids de l'animal.

Les animaux soumis au régime gras ingèrent beaucoup plus de sel (de 150 à 200 mg de sodium/jour) que ceux soumis à un régime normal (de 30 à 40 mg/jour). Ceci vient du fait que plusieurs des aliments de cafétéria qui composent ce régime sont particulièrement riches en sel (jambon, salami, biscuits apéritifs, saucisson et fromage). Cet apport sodé supplémentaire devrait augmenter le volume des liquides extracellulaires, mais pas nécessairement la pression artérielle moyenne. De nombreux processus de régulation physiologiques permettent de maintenir une pression artérielle normale. La consommation élevée de sel et la prise de poids sont deux facteurs de risques de l'hypertension qui est une maladie multifactorielle. Pour connaître précisément l'effet du sel sur la pression artérielle, en dehors de l'effet dû à l'excès d'apports caloriques, il faudrait constituer un groupe de rats recevant un régime normal mais riche en sel et, éventuellement, un groupe de rats recevant un

régime hypercalorique mais avec un apport limité en sel.  
**Apports hydriques** **Apports sodés**

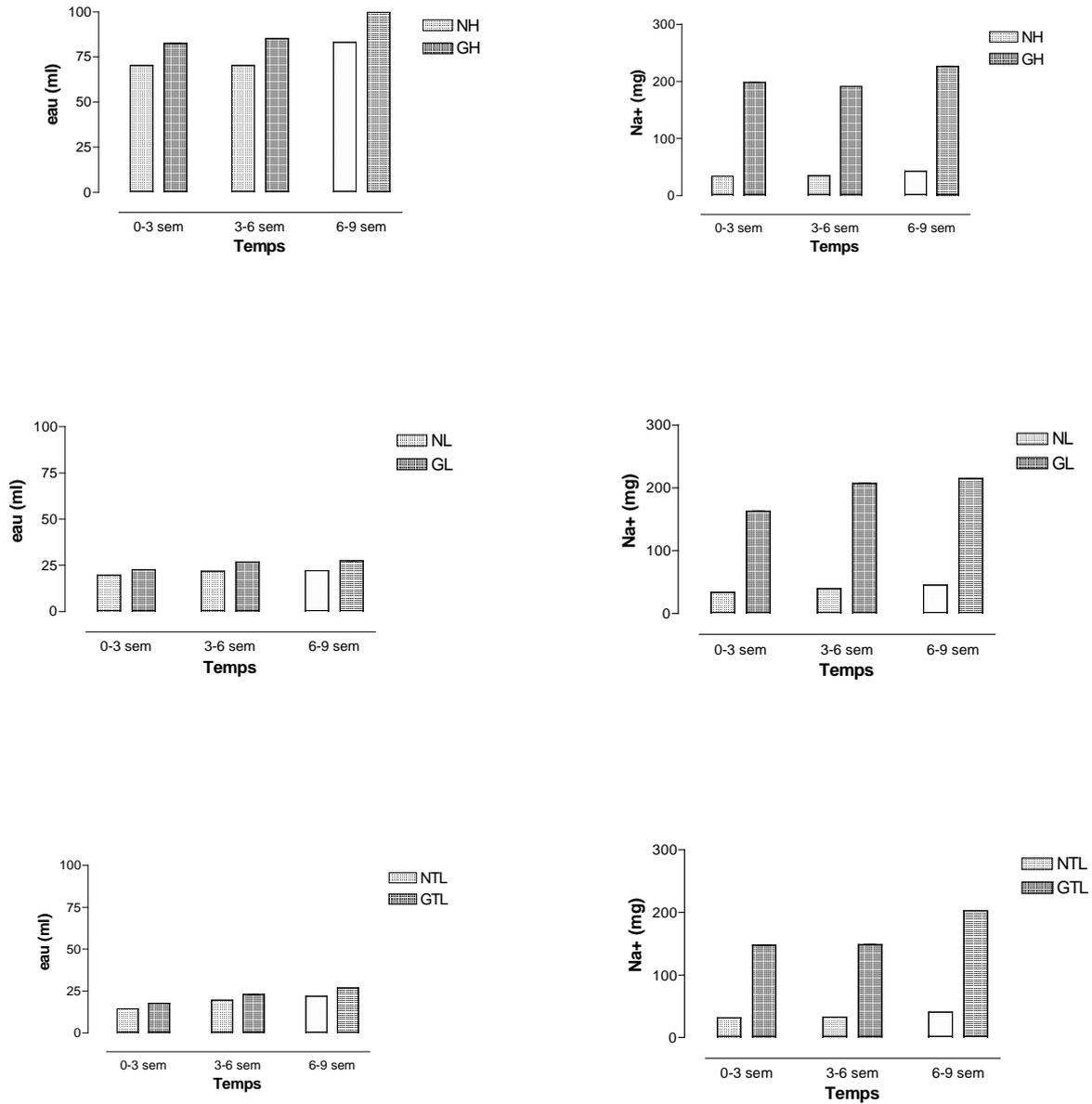


Fig. 3.2 : Comparaison des apports hydriques et sodés au sein des différents groupes d'hydratation, au cours du temps. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  ESM (celles-ci étant à peine visibles).

### 3.1.4. Evolution du poids

Le poids des rats a été mesuré tous les deux jours de manière à bien suivre leur croissance au cours du temps (**Fig. 3.3**). Les courbes de poids des animaux soumis à un régime gras et celles des animaux soumis à un régime normal se distinguent très tôt. L'effet du régime sur le poids est très significatif comme le confirme l'analyse statistique de type ANOVA-2 ( $p < 0,0001$ ). L'évolution des poids des NH et des NL est quasi identique, tout comme celle des GH et GL. En revanche, les rats « TL », fort limités durant les 3 premières semaines, présentent un petit retard de croissance au début, par rapport aux autres groupes, et cette croissance reste un peu plus lente par la suite. Ceci peut s'expliquer par les apports caloriques plus faibles, décrits plus avant.

Ces courbes montrent que le modèle d'obésité a atteint son premier but qui était de distinguer clairement deux groupes d'animaux par leur poids.

### 3.1.5. Mesure de la pression artérielle moyenne (PAM)

La PAM a été mesurée par cathétérisme artériel chez tous les animaux préalablement anesthésiés. Il n'a pas été possible de mesurer la pression artérielle chez l'animal conscient en raison de la non disponibilité du matériel. Les résultats sont présentés dans la **Fig. 3.4**. Chaque graphe compare les animaux soumis au régime gras à ceux soumis au régime normal, au sein d'un même groupe d'hydratation et au cours du temps (3, 6, 9 et 11 semaines). Un groupe de rats normaux n'ayant subi aucun régime particulier sert de contrôle au temps zéro.

Le premier graphe compare les PAM des NH par rapport aux GH au cours du temps. L'analyse statistique de type ANOVA-2 a permis de déterminer que le régime alimentaire ( $p = 0,012$ ) a un effet sur la pression artérielle des animaux hydratés. L'effet du régime est consistant : les PAM sont systématiquement plus élevées chez les « G » que chez les « N » quelle que soit la période où la pression artérielle est mesurée, bien que la différence absolue entre ces deux groupes soit variable. L'effet du régime sur la pression artérielle ne semble pas s'accentuer au cours du temps.

Le deuxième graphe représente les PAM des NL par rapport aux GL. Il n'a pas été possible, ici, de mettre en évidence un effet du régime ( $p = 0,192$ ) sur la PAM. L'absence d'effet statistiquement significatif du régime sur la PAM dans ce groupe est peut-être dû à un nombre d'animaux plus faible ( $n = 8$  pour les NL et  $n = 12$  pour les GL ; les autres groupes contiennent un minimum de 16 rats).

Si l'on groupe les animaux H et L, le régime cafétéria augmente la PAM de façon significative ( $p < 0,0001$ ) quel que soit le niveau d'hydratation. La PAM des « N » est de  $89 \pm 1,65$  ( $n = 33$ ) et celle des « G » est de  $100 \pm 1,35$  ( $n = 45$ ). Le deuxième objectif du modèle, qui était d'observer un effet de l'obésité sur la pression artérielle, a ainsi été atteint.

Le dernier graphe montre les PAM des NTL et des GTL. Dans ce cas, le test statistique a aussi montré un effet du régime ( $p = 0,0004$ ) sur la PAM des animaux. On peut clairement relever sur ce graphe une baisse de pression artérielle chez les rats soumis au régime normal au cours des 6 premières semaines, par rapport aux contrôles.

### Evolution du poids

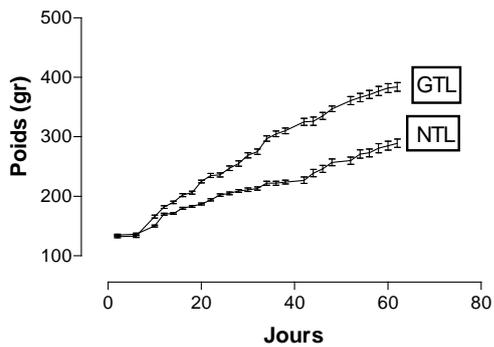
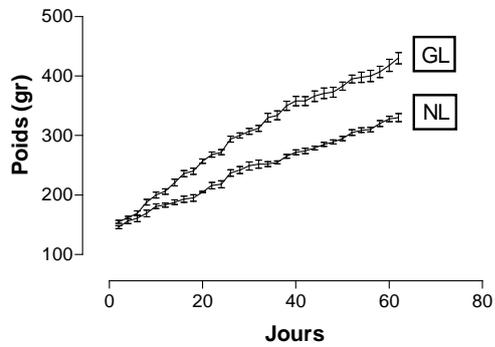
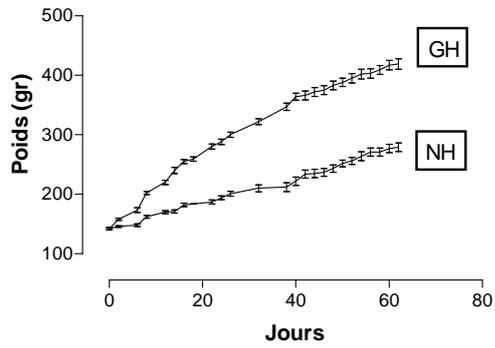


Fig. 3.3 : Comparaison au cours du temps des poids moyens des animaux ( $\pm$  ESM) soumis à un régime gras (G) par rapport à ceux soumis à un régime normal (N), au sein des différents groupes d'hydratation.

### Evolution de la Pression Artérielle Moyenne (PAM)

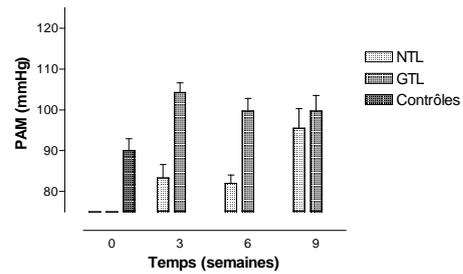
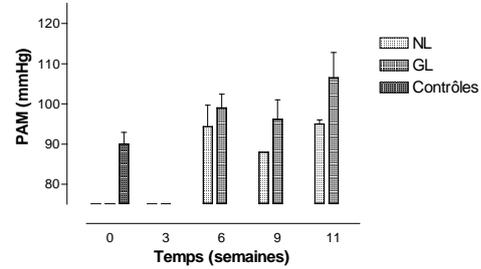
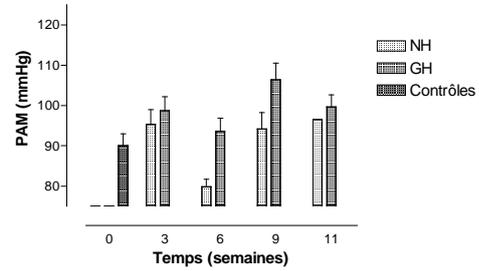


Fig. 3.4 : Comparaison des PAM (moyenne  $\pm$  ESM) des rats "G" et des rats "N".

Ceci pourrait s'expliquer par une réduction drastique du volume circulant et/ou une déshydratation, mais les résultats des dosages plasmatiques ne le confirment pas (cf. plus loin). L'effet du régime sur la PAM au cours des 6 premières semaines est nettement plus marqué dans le groupe des « TL » que dans les groupes « H » et « L », sans qu'il soit facile d'apporter une explication.

Finalement, pour déterminer l'effet global de l'hydratation sur la PAM, à tous moments confondus, une analyse statistique de type ANOVA-1 a été réalisée. Le résultat de ce test est que l'hydratation n'a pas d'effet marqué sur la pression artérielle, ni chez les rats normaux ( $p = 0,42$ ), ni chez les rats soumis au régime gras ( $p = 0,88$ ). Cette conclusion n'est pas modifiée si on limite l'analyse aux animaux « H » et « L ».

En résumé, le régime alimentaire de type cafétéria, qui entraîne un excès de poids chez tous les rats traités, élève légèrement la pression artérielle moyenne, aussi bien chez les animaux hydratés, que chez les rats très limités en eau (et probablement aussi chez les limités en eau même si les tests statistiques ne l'ont pas démontré formellement). L'hydratation ne semble donc pas « protéger » l'animal en voie d'obésité contre le développement de l'hypertension.

### **3.1.6. Suivi de paramètres plasmatiques**

L'hématocrite, l'urée, la créatinine et l'osmolalité ont été mesurés dans les plasmas de tous les animaux, prélevés lors de l'anesthésie (**Tableau 3.2**).

Dans l'ensemble, on ne constate aucune modification majeure de l'un des paramètres. Les animaux contrôles présentent un hématocrite et une concentration plasmatique de créatinine légèrement plus bas que les autres groupes. Il est possible, comme le suggère la créatinine, que les animaux contrôles, âgés de 4 semaines, ne soient pas encore arrivés à l'état adulte du point de vue hématologique et du point de vue de la masse musculaire.

Les concentrations d'urée et de créatinine plasmatiques dépendent du fonctionnement rénal. Le taux de créatinine est représentatif du taux de filtration glomérulaire. Une élévation du taux plasmatique de ces deux substances serait synonyme de problèmes rénaux. Ce qui n'est pas le cas puisque la créatinémie et l'urée plasmatique restent relativement stables dans tous les groupes.

L'hématocrite a été mesuré essentiellement afin de vérifier si aucun des rats ne souffrait de déshydratation. Excepté pour les contrôles, les valeurs obtenues se situent autour de 45 % et ne présentent pas de différences significatives entre les groupes « H », « L » et « TL ». Ces résultats suggèrent que même les animaux très limités en eau ne sont pas franchement déshydratés.

Cette impression est confirmée par les valeurs de l'osmolalité plasmatique, qui ne sont pas significativement différentes entre les groupes ( $p = 0,34$ ). De plus, lorsque l'on examine les rapports urée/créatinine plasmatiques, qui constituent un bon indicateur de déshydratation légère s'ils sont élevés, on ne constate pas de différences marquantes ou systématiques, en dehors des valeurs assez basses observées chez les NH et les GH à 3 semaines.

**Tableau 3.2 : Suivi de paramètres plasmatiques au cours du temps.**

Rats	semaines	n	Hct (%) (ESM < 1,5 %)	Urée plasmatique (mg/dl)	Créatinine plasmatique (mg/dl)	Rapport U/C	Osmolalité plasmatique (mOsm/kg)
Ctrl	0	6	41	11 ± 1	0.63 ± 0.03	18	304 ± 4
NH	3	4	45	9 ± 1	0.81 ± 0.07	<b>12</b>	ND
	6	8	44	14 ± 2	0.74 ± 0.03	19	307 ± 2
	9	6	45	17 ± 2	0.83 ± 0.06	21	304 ± 3
	11	2	45.5	18	0.72	26	298
NL	6	2	45	21	0.91	23	305
	11	2	44	18	0.86	21	305
NTL	3	4	43	13 ± 0	0.78 ± 0	18	ND
	6	4	42	19 ± 3	0.87 ± 0.05	22	307 ± 4
	9	4	46	21 ± 3	0.89 ± 0.07	24	303 ± 2
GH	3	4	45	11 ± 1	0.97 ± 0.05	<b>12</b>	ND
	6	8	46	12 ± 1	0.81 ± 0.05	16	308 ± 3
	9	8	47	19 ± 3	0.88 ± 0.04	22	304 ± 2
	11	4	46	16 ± 1	0.77 ± 0.04	21	304
GL	6	4	46	18 ± 1	0.81 ± 0.05	23	304 ± 3
	9	4	46	19 ± 1	0.85 ± 0.03	23	297 ± 5
	11	4	47	15 ± 2	0.86 ± 0.04	28	303 ± 3
GTL	3	4	45	17 ± 2	0.86 ± 0.03	20.5	ND
	6	4	43	19 ± 2	0.88 ± 0	22	299 ± 4
	9	4	46	20 ± 0	0.84 ± 0.62	24	301 ± 2

Ctrl = rats contrôles au point zéro

Hct = Hématocrite

U/C = rapport urée sur créatinine

ND = non déterminé, volume de plasma insuffisant

Des récoltes urinaires réalisées par un système de cages métaboliques ont aussi été effectuées afin de mesurer certains paramètres urinaires : protéines, osmolalité, et sodium. Cependant, ces résultats ne seront pas présentés en raison de problèmes techniques survenus lors du prélèvement des urines. Dès lors, les valeurs obtenues pour les différents paramètres se sont révélées aberrantes.

### ***3.2. Distribution de l'hyaluronane et de son récepteur CD44 dans le rein***

---

L'un des buts majeurs de ce travail consistait à déterminer avec précision la distribution de l'hyaluronane et de son récepteur CD44 dans le rein de rats soumis à différents régimes. Plusieurs études ont déjà fait état de la localisation de ces deux molécules dans le rein (cf. Introduction) mais ces descriptions sont souvent sommaires et imprécises.

#### **3.2.1. Mise au point de la technique immunohistochimique**

Les techniques de marquage utilisées pour mettre en évidence l'hyaluronane et son récepteur CD44 ont nécessité certaines mises au point avant d'être opérationnelles (test de différentes dilutions de l'anticorps anti-CD44 et de l'HABP, essai de différentes techniques d'amplification du signal, choix des colorations, etc.).

Pour décrire les structures marquées ainsi que leurs localisations, nous suivrons la subdivision du rein décrite dans l'introduction (cortex, OSOM, ISOM, médullaire interne, papille, et urothélium lorsque celui-ci est présent sur la coupe).

#### **3.2.2. Distribution de l'hyaluronane chez les rats contrôles**

Les résultats du marquage de l'hyaluronane dans le rein des rats contrôles sont illustrés par les **Fig. 3.5** et **3.6**. Quelle que soit la région, l'hyaluronane, composant important des matrices extracellulaires, est toujours détecté dans les espaces interstitiels. Néanmoins, sa disposition et son abondance sont variables en fonction des différentes zones du rein.

Dans le cortex (**Fig. 3.5, A**), l'hyaluronane est très peu abondant et se limite à l'interstitium entourant quelques glomérules et quelques tubules distaux et proximaux juxta-glomérulaires, mais dans l'ensemble, ces images sont peu fréquentes. Au niveau du glomérule, le marquage est en contact avec le feuillet pariétal de la capsule de Bowman et, par endroits, révèle quelques points intraglomérulaires. Au cours de ce travail, il n'a pas été possible d'identifier les cellules associées à l'hyaluronane dans le glomérule.

Dans la médullaire externe, le marquage apparaît très dense entre les tubes de l'ISOM tandis qu'il est presque absent au niveau de l'OSOM (**Fig. 3.5, B**). Le marquage dans l'ISOM se trouve entre tous les tubules (collecteurs, grêles et distaux). En coupe transverse, on observe que l'hyaluronane se situe principalement entre les tubes grêles et les vasa recta au niveau des faisceaux vasculaires (« vascular bundles ») et qu'un fin réseau s'insinue entre les tubules collecteurs et distaux (**Fig. 3.5, C** et **Fig. 3.6, A**). Il sera intéressant de postuler les fonctions physiologiques de l'hyaluronane dans ces zones vasculaires particulières de l'ISOM (cf. Discussion).

La transition entre l'ISOM et la médullaire interne est bien visible en raison de l'apparition d'un marquage intense de l'hyaluronane dans tout l'interstitium situé entre les tubules grêles et collecteurs (**Fig. 3.6, A**). En coupe longitudinale, ces tubules entourés d'hyaluronane forment des sortes de longues « colonnes » qui parcourent l'ensemble de la médullaire interne (**Fig. 3.6, B**). Les résultats obtenus dans la médullaire interne confirment ce qui a déjà été décrit dans diverses publications (Wells et al., 1990 ; Johnsson et al., 1997 ; Hansell et al., 2000).

L'hyaluronane a aussi été mis en évidence dans le tissu conjonctif sous-jacent au tissu épithélial urinaire bordant un calice majeur (**Fig. 3.6, C**).

En résumé, le marquage de l'hyaluronane est très réduit au niveau du cortex et de l'OSOM. Il s'intensifie dans l'ISOM et dans la médullaire interne, et s'étend vers la pointe de la papille selon un gradient d'intensité décroissant, l'extrême pointe de la papille étant négative. La présence d'hyaluronane autour des faisceaux vasculaires longitudinaux de l'ISOM est particulièrement frappant.

L'ensemble des observations concernant l'hyaluronane chez les rats contrôles sont récapitulées dans le **Tableau 3.3**.

FIG. 3.5 dans le dossier photos histo

FIG. 3.6 dans le dossier Photos Histo

**Tableau 3.3** Structures positives à l'HABP chez les rats contrôles. L'intensité de marquage est estimée par une échelle semi-quantitative allant de 0 à + + + (établie par deux examinateurs différents).

<b>Région du rein</b>	<b>Structures positives</b>	<b>Intensité de marquage</b>
<i>Ensemble du rein</i>	- Zones conjonctives autour des vaisseaux	+ + +
<i>Cortex</i>	- Zone périphérique de quelques glomérules au contact du feuillet pariétal - Réseau dans les glomérules - Zone périphérique de quelques tubes proximaux et distaux à proximité des glomérules	+ 0 à + +
<i>OSOM</i>	- Fin réseau interstitiel discontinu entre les tubes	+
<i>ISOM</i>	- Interstitium entre les tubes distaux et collecteurs - Interstitium entourant des amas de tubes grêles et de vasa recta	+ + + +
<i>Zone externe de la médullaire interne</i>	- Interstitium entourant les tubes collecteurs, distaux et grêles orientés de façon longitudinale	+ + +
<i>Papille</i>	- Interstitium entre les tubes.	+ + + à 0 selon un gradient décroissant vers la pointe de la papille.
<i>Urothélium</i>	- Conjonctif sous l'urothélium	+ + +

### 3.2.3. Distribution de l'hyaluronane chez les animaux traités

Les **Fig. 3.7** et **3.8** illustrent les marquages de l'hyaluronane au sein des différentes zones du rein, chez les animaux traités.

Dans l'ensemble, la répartition du marquage reste similaire dans tous les groupes expérimentaux. Le marquage est faible dans le cortex et l'OSOM, intense dans l'ISOM et la partie externe de la médullaire interne, et diminue ensuite quand on avance dans la papille. De nombreux résultats expérimentaux publiés (Hansell et al., 2000 ; Göransson et al., 2002), ainsi que les résultats obtenus dans ce travail lors du dosage de l'hyaluronane par radioassay (cf. plus loin), montrent que l'hydratation augmente la quantité d'hyaluronane dans la médullaire interne. Néanmoins, il n'a pas été possible de visualiser cela par la méthode immunohistochimique. A ce propos, il faut préciser que l'intensité du marquage varie de façon non négligeable entre les individus d'un même groupe.

Cependant, des modifications de la répartition de l'hyaluronane ont été observées dans l'ISOM des animaux GH après 3 semaines de régime (**Fig. 3.7, A et B**). Alors que dans les autres groupes le marquage interstitiel s'intensifie autour des tubes grêles et des vasa recta, donnant un aspect en amas (**A**), l'interstitium des GH à 3 semaines est beaucoup plus marqué autour des tubes collecteurs. Simultanément, l'interstitium entre les tubes grêles et les vasa recta ne présente plus qu'un fin réseau d'hyaluronane (**B**). Le marquage de l'hyaluronane est en quelque sorte inversé au sein de l'ISOM des rats GH, mais seulement durant une période limitée du traitement.

Chez ces mêmes animaux, le marquage de l'hyaluronane au niveau de l'urothélium présente également une différence par rapport aux autres groupes (**Fig. 3.8, A et B**) : chez les GH à 3 semaines, l'hyaluronane n'est plus limité au tissu conjonctif sous l'urothélium mais s'insinue entre les cellules des couches basales.

En résumé, l'histologie n'a pas révélé de changements majeurs d'intensité ou de localisation de l'hyaluronane lors des variations de l'apport hydrique ou des quantités d'aliments du régime. Néanmoins, deux modifications remarquables ont été observées au début du régime (3 semaines) associant l'hydratation à une surabondance d'apports caloriques : premièrement, il y a un appauvrissement en hyaluronane dans les faisceaux vasculaires de l'ISOM au profit des régions tubulaires environnantes et, deuxièmement, il y a une pénétration de l'hyaluronane dans les couches profondes de l'urothélium.

FIG. 3.7 et 3.8 dans dossier Photos histo

### 3.2.4. Distribution du CD44 chez les rats contrôles

Le récepteur à l'hyaluronane CD44 a été mis en évidence sur les coupes de rein grâce à un anticorps monoclonal de souris anti-CD44 de rat appelé OX-49 (**Fig. 3.9 et 3.10**).

La distribution du marquage anti-CD44 est semblable à celle de l'hyaluronane au sein des différentes zones du rein. Les structures marquées sont rares dans le cortex et l'OSOM tandis qu'un marquage important apparaît nettement au niveau de l'ISOM. Ce dernier s'étend dans la médullaire interne jusqu'à l'extrémité de la papille selon un gradient d'intensité semblable à celui décrit pour l'hyaluronane. Les structures marquées par l'anti-CD44 sont généralement observées au pôle basal des cellules, ce qui est compatible avec la localisation en membrane plasmique de ce récepteur à l'hyaluronane. Rappelons que l'hyaluronane est limité au tissu interstitiel.

Dans le cortex, les seules structures marquées sont quelques glomérules, quelques macula densa (**Fig. 3.9, B**) et quelques tubules collecteurs (**Fig. 3.9, A**). Dans ces derniers, l'immunoréactivité est limitée au pôle basal des cellules ; cependant, toutes les cellules tubulaires ne semblent pas exprimer le CD44. Dans les glomérules, le marquage est visible sur de courts segments du feuillet pariétal de la capsule de Bowman et parfois sur des cellules intraglomérulaires. La nature de ces cellules n'a pu être déterminée dans le cadre de ce travail. Une autre structure corticale immunopositive est la macula densa, celle-ci étant constituée de quelques cellules d'un tube distal (branche large ascendante de l'anse de Henlé) en contact avec le glomérule. Le CD44 est aussi situé au pôle basal de ces cellules tout en remontant le long des parois latérales (**Fig. 3.9, B**).

Dans l'ISOM, le marquage du CD44 est très intense, tandis que la plupart des tubules collecteurs de l'OSOM sont négatifs (**Fig. 3.9, C**). Les tubules collecteurs de l'ISOM et de la médullaire interne, tout comme ceux du cortex, présentent un marquage basal discontinu (**Fig. 3.10, A et B**). L'expression du CD44 serait-elle réservée à un type cellulaire particulier ? Dans le cadre de ce travail, nous n'avons pas pu réaliser les marquages doubles qui nous auraient permis de préciser la nature des cellules marquées dans les collecteurs, à savoir les cellules principales et/ou les cellules intercalaires.

Enfin, l'urothélium bordant un calice majeur présente aussi un marquage du CD44 à la périphérie des cellules des couches basales de l'épithélium (**Fig. 3.10, C**).

Le **Tableau 3.4** résume les différentes structures marquées.

Fig. 3.9 dans dossier Photos histo

Fig. 3.10 dans dossier Photos histo

**Tableau 3.4** Structures positives au marquage par l'anticorps anti-CD44 chez les rats contrôles. L'intensité de marquage est estimée par une échelle semi-quantitative allant de 0 à + + +, établie par deux examinateurs différents.

<b>Région du rein</b>	<b>Structures positives</b>	<b>Intensité de marquage</b>
<i>Cortex</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Zone basale des tubules collecteurs</li> <li>- Feuillet pariétal de la capsule de Bowman au niveau de quelques glomérules</li> <li>- Quelques cellules intraglomérulaires</li> <li>- Zone basale de quelques macula densa</li> <li>- Quelques cellules interstitielles</li> </ul>	<p style="text-align: center;">+</p> <p style="text-align: center;">+</p> <p style="text-align: center;">0 à +</p> <p style="text-align: center;">+</p> <p style="text-align: center;">+</p>
<i>OSOM</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Zone basale de quelques tubules collecteurs, distaux et proximaux droits</li> </ul>	+
<i>ISOM</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Zone basale de tubes distaux droits (très peu nombreux)</li> <li>- Zone basolatérales des tubes collecteurs et des tubes grêles. Dans les tubules collecteurs, quelques cellules ne sont pas marquées</li> <li>- Quelques cellules interstitielles</li> </ul>	<p style="text-align: center;">0 à +</p> <p style="text-align: center;">0 à +</p> <p style="text-align: center;">+ + +</p> <p style="text-align: center;">+</p>
<i>Partie externe de la médullaire interne</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Identique à l'ISOM. Le marquage diminue lorsqu'on progresse vers l'extrémité de la papille</li> </ul>	+ + + à 0 selon un gradient décroissant
<i>Pointe de la papille</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Zone basale des collecteurs</li> <li>- Les tubes de Bellini de la médullaire profonde ne sont pas marqués</li> </ul>	<p style="text-align: center;">+</p> <p style="text-align: center;">0</p>
<i>Urothélium</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contours des cellules basales de l'urothélium</li> </ul>	+ + +

### **3.2.5. Distribution du CD44 chez les animaux traités**

La répartition du CD44 chez les rats ayant été soumis aux différents régimes (NH, NL, NTL, GH, GL et GTL) est identique à celle décrite chez les animaux contrôles. Aucune différence manifeste n'a été décelée entre les différents groupes expérimentaux. Chacun de ces groupes présente par ailleurs une forte variabilité individuelle.

### **3.2.6. Relation entre les marquages de l'hyaluronane et du CD44**

Les distributions du CD44 et de l'hyaluronane dans le rein de rat sont globalement semblables, tout comme les densités de marquages au sein des différentes zones. L'hyaluronane se localise en général dans l'espace interstitiel autour des tubules dont certains, expriment le CD44. Ceci a été confirmé par un marquage à l'anti-CD44 et à l'HABP sur des coupes consécutives (**Fig. 3.11**).

Les photos A et B de la **Fig. 3.11** illustrent ainsi des champs équivalents du rein (à la limite de l'ISOM et de la médullaire interne) dans lesquels se distinguent des tubes marqués à l'anti-CD44 (A) et où le tissu intertubulaire est occupé par l'hyaluronane (B).

Fig. 3.11 dans dossier Photos histo

### 3.2.7. Détection du CD44 par western blot

La distribution du CD44 dans le rein de rat a aussi été déterminée par western blot dans des homogénats de cortex, de médullaire externe et de médullaire interne, au moyen de l'anticorps monoclonal de souris anti-CD44 de rat. Les résultats sont présentés à la **Fig. 3.12**.

Le CD44 est principalement exprimé dans la médullaire interne, un peu moins dans la médullaire externe et faiblement dans le cortex. La taille observée du CD44 sur ce film est d'environ 45 kDa, ce qui suggère que la forme du CD44 présente dans le rein de rat est peu glycosylée. L'utilisation d'un autre anticorps anti-CD44 polyclonal de lapin (anti HCAM CD44, H-300, Santa Cruz) a confirmé ce résultat. Nous n'avons pas trouvé dans la littérature de valeur précise pour le poids moléculaire du CD44 rénal de rat, évalué par western blot dans des homogénats tissulaires.

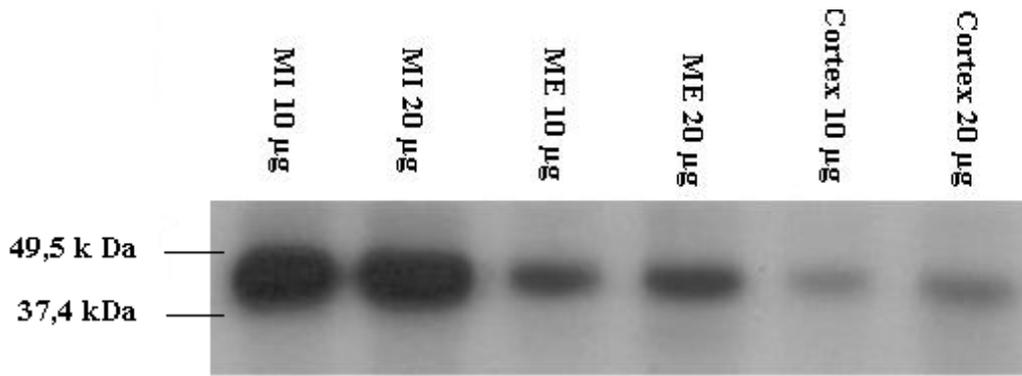
En conclusion, les résultats en western blot confirment la répartition du CD44 rénal observée par marquages immunohistochimiques.

### 3.2.8. Détection de l'hyaluronane par dosages

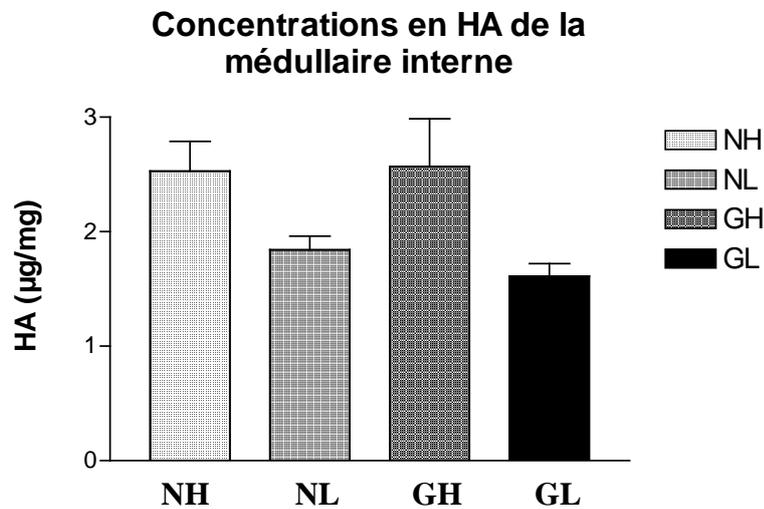
Selon John Hall et son équipe (Alonso-Galicia et al., 1995 ; Hall et al., 1999), l'obésité induirait une accumulation d'hyaluronane dans la médullaire interne du rein, chez le chien et chez le lapin. Pour étudier cela chez le rat, les concentrations d'hyaluronane de la médullaire interne ont été déterminées par un « radioassay » commercial sur base des fragments de rein lyophilisés. Les résultats sont présentés à la **Fig. 3.13**.

Le graphique démontre clairement que la quantité d'hyaluronane dans la médullaire interne est fortement influencée par le niveau d'hydratation de l'animal (ANOVA-2,  $p = 0,007$ ). En effet, les animaux bien hydratés possèdent environ 30 % d'hyaluronane en plus dans la médullaire interne que les limités en eau. Ces résultats vont dans le sens d'une quantité d'eau un peu plus importante dans la médullaire interne d'animaux bien hydratés ( $86 \pm 0,3$  % d'eau pour les « H » et  $83 \pm 0,4$  % pour les « L »). Ces observations sont en accord avec plusieurs études réalisées précédemment chez des rats non obèses (Flamion et al., 1997 ; Hansell and al., 1999 ; Göransson et al., 2002). La relation entre la quantité d'hyaluronane et la proportion d'eau tissulaire de la médullaire interne est représentée dans la **Fig. 3.14**. Le coefficient de corrélation ( $r$ ) de cette droite est de 0,75, chaque paramètre (HA et eau) varie donc de façon significative ( $p < 0,0001$ ) en fonction de l'autre.

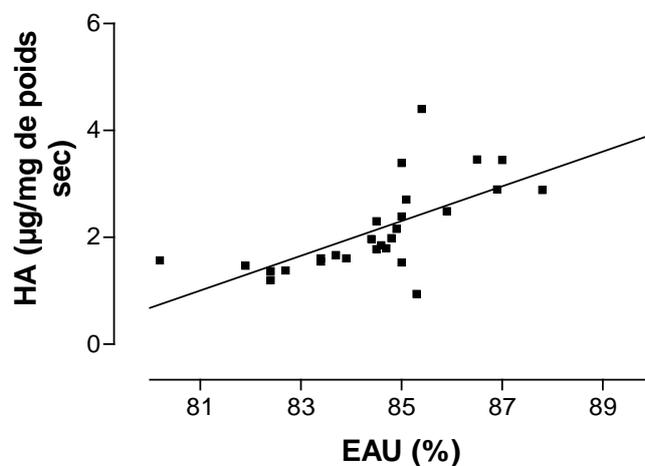
Par contre, l'hypothèse selon laquelle l'hyaluronane s'accumulerait dans la médullaire interne des animaux (chiens et lapins) rendus obèses par un régime gras, et induirait ainsi une réabsorption augmentée de sodium, n'est pas confirmée par les résultats obtenus. Chez le rat, un régime alimentaire hypercalorique riche en lipides et en sel induit un gain de poids très important et une augmentation moyenne de pression artérielle de 11 mmHg mais ne s'accompagne pas d'un dépôt d'hyaluronane dans la médullaire interne. Ceci est plutôt une conséquence du niveau d'hydratation de l'animal. Les observations de l'équipe de John Hall pourraient peut-être s'expliquer par des apports hydriques supplémentaires non contrôlés dans le régime hypercalorique.



**Fig. 3.12** Distribution du CD44 dans les différentes zones du rein. Pour chaque extrait tissulaire de cortex, médullaire externe (ME) et médullaire interne (MI), 10 ou 20 µg de protéines ont été déposées sur le gel.



**Fig. 3.13** Concentrations moyennes ( $\pm$  ESM) en hyaluronane (HA) de la médullaire interne, en µg par mg de poids sec, après 9 semaines de régime normal (N) ou gras (G) avec hydratation abondante (H) ou limitée (L).



**Fig. 3.14** Relation entre la quantité d'hyaluronane présente dans la papille et la quantité d'eau contenue dans le rein. La corrélation est significative ( $r = 0,75$  ;  $p < 0,0001$ ).

### ***3.3. Mise au point d'une technique de dosage de l'hyaluronane***

---

La technique mise au point a été décrite dans « Matériels et Méthode » et peut être résumée en ces quelques phrases : après avoir préparé une résine couplée à de l'hyaluronane et extrait les protéoglycanes du cartilage selon la méthode décrite par A. Tengblad (Tengblad, 1979), les HABP ont été isolées par colonne d'affinité. Pour rappel, l'extrait de cartilage (préparé comme décrit dans le protocole) et la résine couplée à l'HA sont mélangés une nuit dans un milieu de guanidine HCl 0,4M à 4°C. Le mélange est ensuite utilisé pour « packer » la colonne qui est ensuite lavée avec différentes solutions destinées à éliminer les molécules non retenues sur la résine. De la guanidine HCl 4M sert ensuite à élué les HABP retenues sur l'HA de la résine. Les HABP éluées sont alors marquées par un isotope radioactif.

Divers contrôles ont été réalisés au cours de cette expérience :

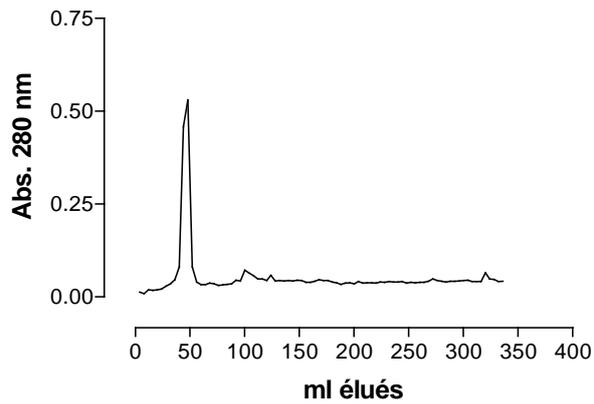
1- Avant de commencer l'isolement des HABP par colonne d'affinité, il a été vérifié que l'hyaluronane était bien fixé sur la résine. Pour cela, l'acide glucuronique, un constituant de l'hyaluronane, a été dosé sur la solution de départ, sur un échantillon de la résine et sur les différents lavages qui ont suivi l'étape de couplage de l'HA à la résine, afin de réaliser un bilan de la fixation. La méthode utilisée est celle décrite par Bitter et Muir (1962) et est basée sur le principe de la réaction entre l'acide glucuronique et le carbazole (Dische, 1947). D'après les résultats obtenus, la quantité d'HA fixée sur la résine est de 50 %, c'est-à-dire qu'environ 160 mg d'HA ont été fixés sur la résine.

2- Après élution des molécules retenues sur l'HA de la résine (**Fig. 3.15**), une aliquote de la fraction enrichie en protéines a été déposée sur gel (**Fig. 3.16**). Le résultat obtenu montre une zone légèrement plus dense située entre 48 et 79 kDa. L'équipe de Tengblad a aussi montré une bande diffuse autour de 68 kDa et une bande faible d'environ 43 kDa.

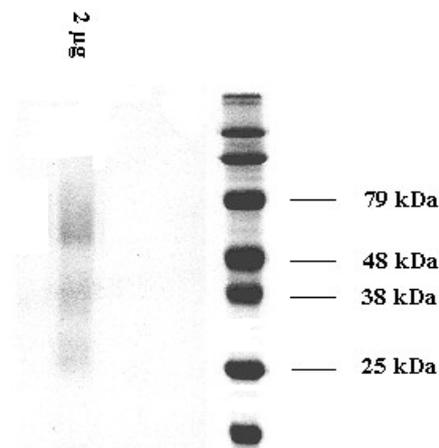
3- Après iodination des HABP par la méthode de l'iodo-Gen, l'activité spécifique de la protéine radiomarquée a été déterminée. Nous avons obtenu une activité spécifique de 30 kBq/μg de protéines. Ce résultat semble satisfaisant puisque Armstrong et Bell (2002) mentionnent une activité spécifique de 25 à 35 kBq/μg de protéines. Le poids moléculaire de l'HABPI\* a aussi été vérifié (**Fig. 3.17**). Celui-ci se situe entre 66 et 97 kDa.

4- Il est connu que l'iodination pourrait abîmer les sites de liaison des HABP et modifier ainsi sa capacité de fixation d'HA (Laurent & Tengblad, 1980). Afin de vérifier si nos HABPI\* étaient toujours capables de fixer de l'HA, nous avons déterminé le taux de fixation des HABPI\* à la résine couplée au HA. Celui-ci est de 28 %. A titre de comparaison, nous avons également mesuré le taux de fixation des HABPI\* à la résine couplée au HA livrée dans le kit commercial de Pharmacia (HA test) et nous avons obtenu 27 % de fixation. Ceci semble tout à fait satisfaisant puisque le critère de base du kit commercial est une fixation devant se situer entre 25 et 30 %.

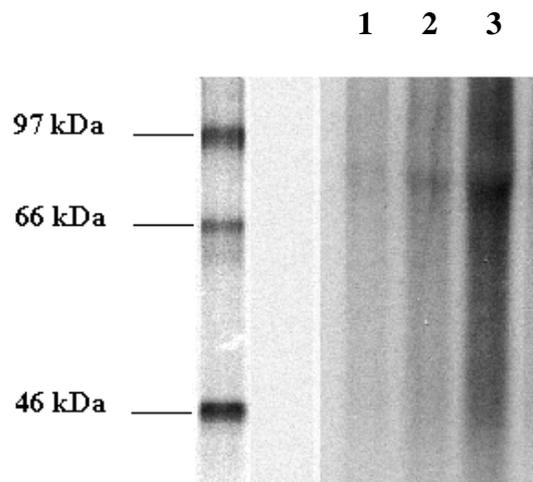
En conclusion, les étapes d'isolement et de marquage radioactif des HABP ont pu être menées à bien, tout en préservant leur capacité de lier l'hyaluronane. Les conditions de dosages dans des échantillons tissulaires restent à mettre au point, mais les résultats obtenus jusqu'ici sont encourageants.



**Fig. 3.15** Pic d'éluéon détecté à 280 nm, après lavage de la résine à la guanidine HCl 4M, tampon acétate 0,5 M, pH = 5,8. Ce pic contient les protéines qui ont été retenues par la résine couplée à l'hyaluronane : les HABP.



**Fig. 3.16** Deux  $\mu\text{g}$  de protéines éluées ont été déposés sur gel. La coloration au bleu de coomacie révèle une bande plus foncée entre 48 et 79 kDa.



**Fig. 3.17** Trois quantités différentes de la protéine radiomarquée ont été déposées sur gel. Le résultat obtenu est une bande plus foncée située entre 66 et 97 kDa.

## 4. Discussion et perspectives

Les différents buts poursuivis dans ce mémoire étaient, pour rappel, la mise au point d'un modèle d'obésité chez le rat, le suivi de ce modèle en terme d'éventuelles variations de la pression artérielle, l'étude de la distribution de l'hyaluronane et de son récepteur CD44 dans le rein, et la mise au point d'une technique quantitative de dosage de l'hyaluronane.

### *4.1. Mise au point du modèle d'obésité*

---

Le régime alimentaire choisi pour entraîner un excès de poids chez les rats Sprague-Dawley mâles, le régime « cafétéria », a déjà été utilisé plusieurs fois afin d'étudier les manifestations physiologiques de l'obésité (Mandenoff et al., 1982 ; Zhou et al., 1998 ; Coatmellec-Taglioni, 2000). L'avantage principal de ce régime est qu'il mime très bien les apports alimentaires gras et salé qu'adoptent souvent les personnes obèses (chocolat, gâteaux sucrés, charcuteries, ...). De plus, ce régime peut être associé à un niveau d'hydratation contrôlé.

Le régime cafétéria s'est montré très efficace au niveau de la prise de poids, tous les rats qui y ont été soumis ont présenté une croissance en poids plus rapide que les rats soumis à un régime normal constitué de croquettes. Les différences de poids entre les deux groupes se sont manifestées très tôt et se sont accentuées au moins jusqu'à la neuvième semaine de régime. Les apports énergétiques étaient fort différents d'un groupe à l'autre tout comme les apports en sel, allant jusqu'à 200 mg de Na<sup>+</sup> chez les rats obèses, par rapport à environ 35 mg chez les rats normaux.

John Hall et son équipe ont déjà mis en évidence une augmentation médullaire d'hyaluronane chez les chiens et les lapins obèses (Alonso-Galicia et al., 1995 ; Dwyer et al., 2000). Cependant, le contenu en hyaluronane du rein peut varier aussi en fonction d'autres paramètres, dont l'hydratation. En effet, Peter Hansell et son équipe ont mis en évidence une augmentation médullaire d'hyaluronane en cas de diurèse élevée. Contrôler le niveau d'hydratation est donc un bon moyen de faire la distinction entre les modifications rénales dues à l'obésité et celles dues à l'hydratation de l'animal. Ainsi, certains rats furent limités en eau et d'autres bien hydratés.

## 4.2. Effet du régime sur la pression artérielle moyenne (PAM)

L'hypertension humaine s'associe très souvent à l'excès pondéral. Il était donc important de mesurer la PAM de tous les rats.

Si on ne prend pas les rats très limités en eau en considération, et que l'on groupe les PAM mesurées aux différents temps, on observe très bien que le régime cafétéria augmente la PAM d'environ 10 mmHg, ce qui constitue une augmentation très significative ( $p < 0,0001$ ). Cet effet apparaît dès la troisième semaine de régime mais ne s'accroît pas avec le temps. Il ne varie néanmoins pas en fonction de l'hydratation de l'animal.

On peut conclure que le régime cafétéria, hypercalorique et salé, élève la pression artérielle chez les rats Sprague-Dawley mâles dès la troisième semaine. D'autres auteurs ont montré que le régime cafétéria n'augmente pas la PAM chez les rats femelles. De façon intéressante cette différence entre les deux genres est liée au fait que les mâles présentent une désensibilisation des récepteurs à la leptine (Coatmellec-Taglioni et al., 2003). L'effet du sexe n'a pas été testé dans nos expériences.

Le rôle du sel dans l'évolution de la PAM des rats ne doit pas être négligé. Cependant, les suppléments sodés en eux-mêmes induisent une variation du volume du liquide extracellulaire mais sans pour autant entraîner une hypertension. De nombreux processus de régulation physiologiques y veillent. Par contre, il a été démontré que ces processus sont parfois défaillants suite à certains problèmes sous-jacents. Ainsi, certaines personnes développent ce qu'on appelle une hypertension sensible au sel (Guyton, 1987 ; Hall, 2003). Cette forme d'hypertension est fréquente chez les personnes âgées, les personnes d'origine africaines, les diabétiques et les obèses. De nombreux modèles expérimentaux, congénitaux ou acquis, permettent de reproduire cette hypertension et de l'étudier.

Bien que la sensibilité au sel soit un paramètre crucial dans le développement de nombreuses hypertensions, ses mécanismes restent mal compris. De multiples hypothèses sont soulevées. Toutes partent du principe qu'il existe une anomalie rénale, congénitale ou acquise, qui réduit la capacité d'excrétion du sodium et provoque secondairement la sensibilité au sel. Ce phénomène peut aussi se décrire comme un déplacement de la courbe de pression-natriurèse, ce qui signifie que pour excréter la même quantité de sel, il est nécessaire d'augmenter la pression artérielle. Les anomalies rénales sous-jacentes à l'hypertension sensible au sel sont probablement subtiles (Johnson et al., 2002). Parmi celles-ci on trouve : une réduction congénitale du nombre de néphrons (connue comme « l'hypothèse de Brenner » [Brenner et al., 1988]), une insuffisance de facteurs vasoactifs intrarénaux comme le NO, un excès de facteurs vasoconstricteurs comme le système rénine-angiotensine, ou encore des facteurs vasculaires : insuffisance de perfusion de la médullaire ou vasoconstriction artériolaire chronique (Johnson et al., 2002). Dans cette optique, l'obésité pourrait induire une sorte de lésion rénale subtile qui serait à la base d'une hypertension sensible au sel. Mais ceci n'est bien sûr qu'une hypothèse.

Le fait que, dans le modèle d'obésité utilisé, l'hypertension soit apparue suite à une combinaison d'excès énergétiques et sodés n'est pas nécessairement un désavantage. Il serait bien sûr intéressant de pouvoir distinguer l'effet du sel de celui de l'apport hypercalorique dans des études ultérieures.

### ***4.3. Etude de la distribution rénale de l'hyaluronane***

---

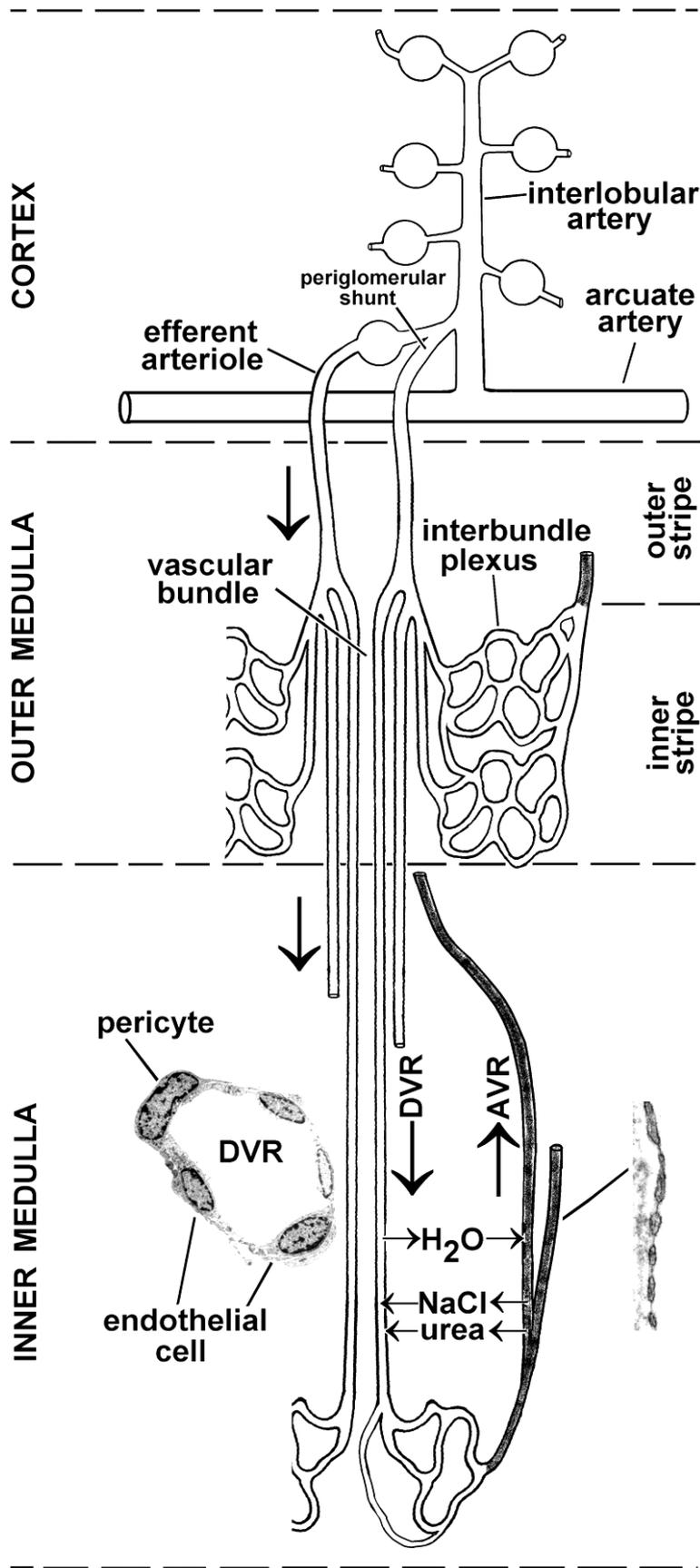
L'un des buts premiers de ce travail était de confirmer, chez le rat, les observations de John Hall réalisées chez le chien et le lapin, à savoir l'accumulation médullaire d'hyaluronane chez les animaux obèses hypertendus. La distribution rénale de l'hyaluronane a donc été déterminée par marquages immunohistochimiques et sa quantité a été mesurée dans la médullaire interne.

Néanmoins, ces techniques ne permirent pas de mettre en évidence des différences quantitatives d'hyaluronane entre les rats soumis au régime normal et ceux soumis au régime gras. Seule une différence entre les rats hydratés et ceux limités en eau a été observée par dosage de l'hyaluronane. Ainsi, les rats bien hydratés présentent un niveau médullaire d'hyaluronane nettement plus élevé que les rats limités en eau. Cette différence n'a pas pu être confirmée par la technique de marquage immunohistochimique. Il est possible que l'hydratation n'ait pas été bien contrôlée au sein du régime hypercalorique utilisé par John Hall et que cette variable explique les différences de quantité d'hyaluronane qu'il observe.

Les marquages histologiques de l'hyaluronane ont apporté des renseignements qualitatifs très intéressants sur la localisation précise de ce polymère au sein des différentes zones du rein.

Chez le rat contrôle, la présence d'hyaluronane a été mise en évidence dans la paroi vasculaire, dans le feuillet pariétal de la capsule de Bowman, autour de quelques cellules intraglomérulaires (peut-être mésangiales), et entre les différents tubules du cortex et de la médullaire. Ces descriptions étaient déjà connues, mais nous sommes en mesure d'ajouter deux observations originales :

1. Présence d'hyaluronane dans le conjonctif sous l'urothélium qui est au contact des calices majeurs. De façon intéressante, ces dépôts d'hyaluronane se modifient chez les rats surhydratés soumis à un régime hypercalorique, mais ce changement (pénétration de l'hyaluronane dans les couches profondes de l'urothélium) est transitoire, il n'est visible qu'après 3 semaines de régime et disparaît par la suite. L'hyaluronane sous-urothélial pourrait jouer un rôle dans la relative imperméabilité de cette zone à l'urine présente dans les calices
2. Nette concentration d'hyaluronane dans les faisceaux vasculaires (vascular bundles) de la couche interne de la médullaire externe (Kritz and Kaissling, 2000). Ces faisceaux sont constitués d'un rassemblement de tubes grêles et de vasa recta, et jouent un rôle important dans la régulation du fluide tubulaire, principalement au niveau de l'anse grêle de Henlé. Un rôle d'« isolant » vis à vis de la médullaire interne (permettant le maintien du gradient d'osmolalité médullaire nécessaire au mécanisme de concentration des urines) a aussi été postulé. Mais avant tout, les faisceaux vasculaires sont le centre de contrôle de la microcirculation médullaire, et ce grâce aux actions paracrines qui s'exercent sur les péricytes des vasa recta descendants (Pallone et al., 2003 ; **Fig. 4.1**). Parmi ces actions paracrines se trouve l'action de l'angiotensine II qui permettrait la régulation de l'excrétion d'eau et de sel, ainsi que de l'oxygénation médullaire. En physiopathologie, des dysfonctions des vasa recta ont déjà été évoquées dans l'hypertension artérielle essentielle, dans la néphropathie aux analgésiques, etc. (Pallone et al., 2003).



**Fig. 4.1** Schéma de la vasculature rénale. Les faisceaux vasculaires (vascular bundles) sont situés dans la médullaire externe.

Le fait que ces faisceaux vasculaires médullaires soient si riches en hyaluronane est une observation très intéressante, d'autant plus que c'est la première fois que cela est décrit.

Outre ces deux points, l'immunohistochimie a aussi permis d'observer une modification de la disposition de l'hyaluronane dans la couche interne de la médullaire externe. Ainsi, chez les rats bien hydratés et suralimentés, après 3 semaines de régime, l'hyaluronane semble avoir largement quitté les faisceaux vasculaires, au profit de l'interstitium situé entre les autres tubules de la médullaire. Cette observation serait cruciale si elle était spécifiquement associée (même transitoirement) au développement de l'hypertension, mais ce n'est pas le cas puisque tous les animaux soumis à un régime gras deviennent hypertendus et pas seulement les rats obèses hydratés. La relation entre l'hyaluronane et les faisceaux vasculaires de la médullaire externe devrait être explorée plus finement à l'avenir.

#### ***4.4. Etude de la distribution rénale du récepteur à l'hyaluronane : CD44***

---

L'observation des coupes histologiques a permis de visualiser le CD44 sur différentes structures : à la base des tubules collecteurs, au niveau du feuillet pariétal de quelques glomérules, au niveau de la zone basale de la macula densa, à la base de quelques cellules des tubules proximaux, distaux et grêles, et sur les cellules basales de l'urothélium. Il est assez frappant de voir que le récepteur est concentré sur la zone baso-latérale des cellules des tubules collecteurs, que ce soit dans le cortex ou la médullaire (excepté dans l'extrême pointe de la papille qui est négative). De plus, ce marquage semble limité à certaines cellules, et peut-être même à un seul type cellulaire. Il n'a cependant pas été déterminé, dans le cadre de ce travail, la nature de ces cellules (cellules principales et/ou intercalaires).

Le marquage sur les cellules de la macula densa est aussi très intéressant, mais cette observation n'étant pas systématique, il faut se garder actuellement de tirer des conclusions hâtives.

Par ailleurs, le CD44 ne présente pas la même distribution que l'hyaluronane au sein des faisceaux vasculaires.

#### ***4.5. Mise au point d'une technique de dosage de l'hyaluronane***

---

Les premières étapes de ce travail ont été réalisées avec succès : nous avons obtenu, au départ de cartilage trachéal de bœuf, une quantité satisfaisante de HABP radiomarquée dont la capacité à lier l'hyaluronane ne semble pas avoir été altérée. Il reste nécessaire de déterminer les conditions expérimentales du dosage.

## 5. Bibliographie

- Alonso-Galicia, M., Dwyer, T. M., Herrera, G. A. & Hall, J. E. Increased hyaluronic acid in the inner renal medulla of obese dogs. *Hypertension* **25**, 888-892 (1995).
- Armstrong, S. E. & Bell, D. R. Measurement of high-molecular-weight hyaluronan in solid tissue using agarose gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **308**, 255-264 (2002).
- Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C. B. & Seed, B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* **61**, 1303-1313 (1990).
- Atkins, E. D. & Sheehan, J. K. Structure for hyaluronic acid. *Nat. New Biol.* **235**, 253-254 (1972).
- Bajorath, J., Greenfield, B., Munro, S. B., Day, A. J. & Aruffo, A. Identification of CD44 residues important for Hyaluronan binding and delineation of the binding site. *J. Biol. Chem.* **273**, 338-343 (1998).
- Baker, J. R. & Caterson, B., The isolation and characterization of the link proteins from proteoglycan aggregates of bovine nasal cartilage. *J. Biol. Chem.* **254**, 2387-2393 (1979).
- Balazs, E. A., Laurent, T. & Jeanloz, R. W. Nomenclature of hyaluronic acid. *Biochem. J.* **235**, 903 (1985).
- Bartolazzi, A., Peach, R., Arruffo, A. & Stamenkovic, I. Interaction between CD44 and hyaluronate is directly implicated in the regulation of tumor development. *J. Exp. Med.* **180**, 53-66 (1994).
- Bitter, T. & Muir, H. M. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.* **4**, 330-334 (1962).
- Bouby, N., Bachmann, S., Bichet, D. & Bankir, L. Effect of water intake on the progression of chronic renal failure in the 5/6 nephrectomized rat. *Am. J. Physiol.* **258**, F973-F979 (1990).
- 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).
- Brands, M. W., Hall, J. E., Van Vliet, B. N., Alonso-Galicia, M. Herrera, G. A. & Zappe, D. Obesity and hypertension : roles of hyperinsulinemia, sympathetic nervous system and intrarenal mechanisms. *J. Nutr.*, **125**, 1725S-1731S (1995).
- Brunner, B. M., Garcia, D. L. & Anderson, S. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am. J. Hypertens.* **1**, 335-347 (1988).
- Burt, V. L., Whelton, P., Roccella, E. J., Brown, C., Culter, J. A., Higgins, M., Horan, M. J. & Labarthe, D. Prevalence of hypertension in the US adult population, *Hypertension* **25**, 303-313 (1995).
- Coatmellec-Taglioni, G., Dausse, J-P., Giudicelli, Y. & Ribière, C. Sexual dimorphism in cafeteria diet-induced hypertension is associated with gender-related difference in renal leptin receptor down-regulation. *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics* **305**, 362-367 (2003).
- Coatmellec-Taglioni, G., Dausse, J-P., Ribière C. & Giudicelli, Y. Hypertension in cafeteria-fed rats : alterations in renal  $\alpha_2$ -adrenoceptor subtypes. *Am. J. Hypertens.* **13**, 529-534 (2000).
- Comper, W. D. & Laurent, T. C. Physiological function of connective tissue polysaccharides. *Physiol. Rev.* **58**, 255-315 (1978).
- Csoka, B. A., Frost, G. I. & Stern, R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol.* **20**, 499-508 (2001).

- Culty, M., Nguyen H. & Underhill, C. B. The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan. *J. Cell. Biol.* **116**, 1055-1062 (1992).
- Dalchau, R., Kirkley, J. & Fabre, J. W. Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to the leukocyte-common (L-C) antigen of the rat. *Eur. J. Immunol.* **10**, 737-744 (1980).
- Delpech, B. & Halavent, C. Characterization and purification from human brain of a hyaluronic acid-binding glycoprotein, hyaluronectin. *J. Neurochem.* **36**, 855-859 (1981).
- DiBona, G. F. & Kopp, U. C. Neural control of renal function. *Physiol. Rev.* **77**, 75-197 (1997).
- Dische, Z. A new specific color reaction of hexuronic acids. *J. Biol. Chem.* **167**, 189-198 (1947).
- Dobrian, A. D., Davies, M. J., Prewitt, R. L. & Lauterio, T. J. Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension* **35**, 1009-1015 (2000).
- Dwyer, T. M., Banks, S. A., Alonso-Galicia, M., Kockrell, K., Carroll, J. F., Bigler, S. A. & Hall, J. E., Distribution of renal medullary hyaluronan in lean and obese rabbits. *Kidney Int.* **58**, 721-729 (2000).
- Flamion, B., Lacreman, J. & Mertens-Strijthagen, J. Effect of water intake on renal inner medullary hyaluronan (HA) and hyaluronidase. *J. Am. Soc. Nephrol.* **8**, 17A (1997).
- Flamion, B., Mertens-Strijthagen, J., Bernier, B. & Boël, P. Primary culture of rat inner medullary interstitial cells : evidence for hyaluronan-synthesizing and degrading activities. *Nephrol. Dial. Transplant.* **15**, 2534 (2000).
- Florquin, S., Nunziata, R., Claessen, N., van den Berg, F. M., Pals, S. T. & Weening, J. J. CD44 expression in IgA nephropathy. *Am. J. Kidney Dis.* **39**, 407-414 (2002).
- Goodfellow, P. N., Banting, G., Wiles, M. V., Tunnacliffe, A., Parkar, M., Solomon, E., Dalchau, R. & Fabre, J. W. The gene, MIC4, which controls expression of the antigen defined by monoclonal antibody F10.44.2, is on human chromosome 11. *Eur. J. Immunol.* **12**, 659-663 (1982).
- Göransson, V., Johnsson, C., Nylander, O. & Hansell, P. Renomedullary and intestinal hyaluronan content during body water excess: a study in rats and gerbils. *J. Physiol.* **542.1**, 315-322 (2002).
- Guyton, A. C. & Hall, J. E. The kidney and body fluids. In *Textbook of Medical Physiology 9th edition*. W. B Saunders, Philidelphia, 297-421 (1996).
- Guyton, A. C. Renal function curve : a key to understanding the pathogenesis of hypertension. *Hypertension* **10**, 1-6 (1987).
- Hall, J. E. Mechanisms of abnormal renal sodium handling in obesity hypertension. *Am. J. Hypertens.* **10**, supplément 1, 49S-55S (1997).
- Hall, J. E. Pathophysiology of obesity hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* **2**, 139-147 (2000).
- Hall, J. E. The kidney, hypertension, and obesity. *Hypertension* **41**, 625-633 (2003).
- Hall, J. E., Brands, M. W., Hildebrandt, D. A., Kuo, J. & Fitzgerald, S. Role of sympathetic nervous system and neuropeptides in obesity hypertension. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **33**, 605-618 (2000).
- Hall, J. E., Hildebrandt, D. A. & Kuo, J. Obesity hypertension: role of leptin and sympathetic nervous system. *Am. J. Hypertens.* **14**, 103S-115S (2001).
- Hällgren, R., Gerdin, B. & Tufveson G. Hyaluronic acid accumulation and redistribution in rejecting rat kidney graft : relationship to the transplantation edema. *J. Exp. Med.* **171**, 2063-2076 (1990).

- 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 (2000).
- 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**, 115-116 (1999).
- Hardingham, T. E. & Muir, H. The specific interaction of hyaluronic acid with cartilage proteoglycans. *Biochim. Biophys. Acta* **279**, 401-405 (1972).
- Hunderhill, C. CD44: The hyaluronan receptor. *J. Cell Sci.* **103**, 293-298 (1992).
- Isacke, C. M. & Yarwood, H. The hyaluronan receptor, CD44. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 718-721 (2002).
- Johnson, R. J., Herrera-Acosta, J., Schreiner, G. F. & Rodriguez-Iturbe, B. Subtle acquired renal injury as a mechanism of salt-sensitive hypertension. *N. Engl. J. Med.* **346**, 913-923 (2002).
- Johnsson, C., Hällgren, R., Wahlberg, J. & Tufveson, G. Renal accumulation and distribution of hyaluronan after ureteral obstruction. *Scand. J. Urol. Nephrol.* **31**, 327-331 (1997).
- Johnsson, C., Tufveson, G., Wahlberg, J. & Hällgren, R. Experimentally-induced warm renal ischemia induces cortical accumulation of hyaluronan in the kidney. *Kidney int.* **50**, 1224-1229 (1996).
- Kaissling, B., Hegyi, I. & Le Hir, M. Morphology of interstitial cells in the healthy kidney. *Anat. Embryol.* **193**, 303-318 (1996).
- Kassab, S., Kato, T., Clayton, W., Chen, R., Hall, J. E. & Granger, J. P. Renal denervation attenuates the sodium retention and hypertension associated with obesity. *Hypertension* **25**, 893-897 (1995).
- Knepper, M. A., Saidel, G. M., Hascall, V. C. & Dwyer, T. Concentration of solutes in the renal inner medulla: interstitial hyaluronan as a mechano-osmotic transducer. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **284**, F433-F446 (2003).
- Kriz, W. & Kaissling, B. Structural organization of the mammalian kidney. *Kidney* **1**, 587-654 (2000).
- Kuczmarski, R. J., Flegal, K. M., Campbell, S. M. & Johnson, C. L. Increasing prevalence of overweight among US adults. The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1960 to 1991. *JAMA* **272**, 238-239 (1994).
- Landsberg, L. Hyperinsulinemia : possible role in obesity-induced hypertension. *Hypertension* **19**, I61-I66 (1992).
- Laurent, T. C. & Fraser, J. R. E. Hyaluronan. *FASEB J.* **6**, 2397-2404 (1992).
- Laurent, T. C., Laurent, U. B. & Fraser, J. R. The structure and function of hyaluronan : an overview, *Immunol. Cell. Biol.* **74**, A1-A7 (1996).
- Laurent, U. B. G. & Tengblad, A. Determination of hyaluronate in biological samples by a specific radioassay technique. *Anal. Biochem.* **109**, 386-394 (1980).
- LeBaron, R. G., Zimmermann, D. R. & Ruoslahti, E. Hyaluronate binding properties of versican. *J. Biol. Chem.* **267**, 10003-10010 (1992).
- Lee, J. Y. & Spicer, A. P. Hyaluronan : a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Curr. Opin Cell Biol.* **12**, 581-586 (2000).
- Lee, T. H., Wisniewski, H. G. & Vilcek, J. A novel secretory 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).
- 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. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **278**, R247-R254 (2000).

- Lin, W., Shuster, S., Maibach, H. I. & Stern, R. Patterns of hyaluronan staining are modified by fixation techniques. *J. Histochem. Cytochem.* **45**, 1157-1164 (1997).
- Mandenoff, A., Lenoir, T. & Apfelbaum, M. Tardy occurrence of adipocyte hyperplasia in cafeteria-fed rat. *Am. J. Physiol.* **242**, R349-R351 (1982).
- Martin, T. A., Harrisson, G., Mansel, R. E. & Jiang, W. G. The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **46**, 165-186 (2003).
- Meyer, K. & Palmer, J. W. The polysaccharide of the vitreous humor. *J. Biol. Chem.* **107**, 629-634 (1934).
- Mikhail, N., Golub, M. S. & Tuck, M. L. Obesity and hypertension. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **42**, 39-58 (1999).
- Montani, J. P., Antic, V., Yang, Z. & Dulloo A. Pathways from obesity hypertension : from the perspective of a vicious triangle. *Int. J. Obes. Metab. Disord.* **26**, S28-S38 (2002).
- Mowry, R. W., Alcian blue technics for histochemical properties of rodent acid mucopolysaccharides. *J. Hist. Cytochem.* **407** (1956).
- 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).
- Neame, P. J. & Barry, F. P. The link proteins. *EXS.* **70**, 53-72 (1994).
- Pallone, T., Zhang, Z. & Rhinehart, K. Physiology of the renal medullary microcirculation. *Am. J. Renal Physiol.* **284**, F253-F266 (2003).
- Patel, D. D., Hale, L. P., Whichard, L. P., Radcliff, G., Mackay, C. R. & Haynes, B. F. Expression of CD44 molecules and CD44 ligands during human thymic fetal development : expression of CD44 isoforms is developmentally regulated. *Int. Immunol.* **7**, 277-286 (1995).
- Pitcock, J. A., Lyons, H., Brown, P. S., Rightsel, W. A. & Muirhead, E. E. Glycosaminoglycans of the rat renomedullary interstitium: ultrastructural and biochemical observations. *Exp. Mol. Pathol.* **49**, 373-387 (1988).
- Ponta, H., Wainwright, D. & Herrlich, P. The CD44 protein family. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **30**, 299-305 (1998).
- Reale, E., Luciano, L. & Spitznas, M. Histochemical demonstration of hyaluronic acid molecules by alcian blue. *Histochem. J.*, **18**, 306-316 (1986).
- Rioux-Leclercq, N., Epstein, J. I., Bansard, J. Y., Turlin, B ; Patard, J. J., Manunta, A., Chan, T., Ramee, M. P., Lobel, B. & Moulinoux, J. P. Clinical significance of cell proliferation, microvessel density, and CD44 adhesion molecule expression in renal cell carcinoma. *Hum. Pathol.* **32**, 1209-1215 (2001).
- Robles, R. G., Villa, E., Santirso, R., Martinez, J., Ruilope, L. M., Cuesta, C. & Sancho, J. M. Effects of captopril on sympathetic activity, lipid and carbohydrate metabolism in a model of obesity-induced hypertension in dogs. *Am. J. Hypertens.* **6**, 1009-1015 (1993).
- Rothwell, N. J. & Stock, M. J. A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature* **281** (5726), 31-35 (1979).
- Sands, J. M. & Layton, H. E. Urine concentrating mechanism and its regulation. *Kidney*, **1**, 1175-1216 (2000).
- Sano, N., Kitazawa, K. & Sugisaki, T. Localization and roles of CD44, hyaluronic acid and osteopontin in IgA nephropathy. *Nephron.* **89**, 416-421 (2001).
- Schoorlemmer, G. H. & Evered, M. D. Reduced feeding during water deprivation depends on hydration of the gut. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* **283**, R1061-R1069 (2002).

- Scott, J. E. Secondary structure in hyaluronan solutions: chemical and biological implications. *The biology of hyaluronan (Ciba Foundation Symposium)* **143**, 6-20 (1989).
- Scott, J. E., Cummings, C., Brass, A. & Chen, Y. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is very efficient network-forming polymer. *Biochem. J.* **274**, 699-705 (1991).
- Shek, E. W., Brands, M. W. & Hall, J. E. Chronic leptin infusion increases arterial pressure. *Hypertension* **31**, 409-414 (1998).
- Stamler, R., Stamler, J., Riedlinger, W. F., Algera, G. & Roberts, R. H. Weight and blood pressure. Findings in hypertension screening of 1 million Americans, *JAMA* **240**, 1607-1610 (1978).
- Tengblad, A. Affinity chromatography on immobilized hyaluronate and its application to the isolation of hyaluronate binding proteins from cartilage. *Biochim. Biophys. Acta.* **578**, 281-289 (1979).
- Tuck, M. L., Sowers, J. & Dornfeld, L. The effect of weight reduction on blood pressure, plasma renin activity, and plasma aldosterone levels in obese patients. *N. Engl. J. Med.* **304**, 930-933 (1981).
- Tuhkanen, A. L., Agren, U. M., Tammi, M. I. & Tammi, R. H. CD44 expression marks the onset of keratinocyte stratification and mesenchymal maturation into fibrous dermis in fetal human skin. *J. Histochem. Cytochem.* **47**, 1617-1624 (1999).
- Underhill, C. CD44 : The hyaluronan receptor. *J. Cell Sci.* **103**, 293-298 (1992).
- Watanabe, H., Yamada, Y. & Kimata, K. Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan, in cartilage structure and function. *J. Biochem.* **124**, 687-693 (1998).
- 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. Com.*, **294**, 918-922 (2002).
- Wells, A. F., Larsson, E., Tengblad, A., Fellström, B., Tufveson, G., Klareskog, L. & Laurent, T. C. The localization of hyaluronan in normal and rejected human kidneys, *Transplantation* **50**, 240-243 (1990).
- Zhou, X., De Schepper, J., De Craemer, D., Delhase, M., Gys, G., Smits, J. & Hooghe-Peters, E. L. Pituitary growth hormone release and gene expression in cafeteria-diet induced obese rats. *J. Endocrinol.* **159**, 165-172 (1998).

