

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE À FINALITÉ APPROFONDIE

Etude de l'implication du monoxyde d'azote dans les mécanismes physiopathologiques sous-jacents de la néphropathie liée à l'obésité dans un modèle murin

Depommier, Clara

*Award date:*  
2014

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[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.

**UNIVERSITE DE NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**ETUDE DE L'IMPLICATION DU MONOXYDE D'AZOTE DANS LES MECANISMES  
PHYSIOPATHOLOGIQUES SOUS-JACENTS DE LA NEPHROPATHIE LIEE A  
L'OBESITE DANS UN MODELE MURIN**

**Mémoire présenté pour l'obtention**

**du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Clara DEPOMMIER

Janvier 2014

**Université de Namur**  
**FACULTE DE SCIENCES**  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 – 5000 NAMUR  
Téléphone : +32(0)81.72.44.18 – Téléfax : + 32(0)81.72.44.20  
E-mail : Joelle.jonet@unamur.be - <http://www.unamur.be>

## **Etude de l'implication du monoxyde d'azote dans les mécanismes physiopathologiques sous-jacents de la néphropathie liée à l'obésité dans un modèle murin**

DEPOMMIER Clara

### Résumé

Avec une incidence en constante augmentation depuis ces 20 dernières années, l'obésité est devenu un problème majeur de santé publique, tout particulièrement dans les pays occidentaux. Cette pathologie affecte tous les groupes d'âge incluant les enfants et les adolescents et est maintenant considérée comme un facteur déterminant du développement et la progression de l'insuffisance rénale chronique (IRC). Parmi les facteurs impliqués dans les processus physiopathologiques conduisant à la néphropathie, nous nous sommes intéressés au rôle potentiel du monoxyde d'azote (NO). Afin de caractériser les altérations structurelles et fonctionnelles du rein ainsi que d'évaluer l'implication du NO dans la progression des atteintes rénales associées à l'obésité, des souris mâles C57Bl/6 ont été nourries soit avec un régime faible en graisses (Low-Fat Diet), soit avec un régime riche en graisses (High-Fat Diet) et ce, pendant 16 semaines. Les animaux HFD sont caractérisés par une masse corporelle importante, une hyperglycémie, des concentrations plasmatiques élevées en acides gras non-estérifiés ainsi qu'une hypertrophie rénale. Les analyses histologiques ont révélé des caractéristiques de l'IRC telles qu'une augmentation de la surface glomérulaire et des altérations tubulaires résultant d'une accumulation de vacuoles aux seins des cellules. Ces observations sont associées à une albuminurie et à une augmentation du stress oxydatif et une réduction de l'excrétion en nitrite/nitrate (NOx). Ces résultats suggèrent une implication potentielle du NO dans la progression de ce type de néphropathie. En ce qui concerne notre démarche interventionnelle, les souris HFD ont été traitées à l'aide de deux outils pharmacologiques : Le L-NIL (un inhibiteur spécifique de la NOS inductible) et la Myriocine (un inhibiteur de la synthèse de céramide). Les souris HFD traitées avec du L-NIL ont manifesté une réduction significative du poids corporel et de l'hyperglycémie. Cependant le traitement ne prévient pas l'apparition de lésions rénales associées à l'obésité malgré une diminution de l'expression de la iNOS. Chez les souris traitées avec la myriocine, le traitement limite considérablement la prise de poids, l'hyperglycémie, l'hypertrophie rénale ainsi que l'accumulation de vacuoles au sein des tubules rénaux. Les résultats obtenus au cours de cette étude ouvrent de nombreuses perspectives interventionnelles en vue de prévenir les altérations systémiques et rénales induites par l'obésité.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2014

**Promoteur:** Nathalie Caron

---

## Remerciements

---

Avant toutes choses, je tiens à dire que ce mémoire fut une expérience positive pour moi et m'a fait gagner en maturité malgré les difficultés et les doutes. J'ai beaucoup appris d'un point de vue professionnel et relationnel. Je ressors de cette expérience grandie et plus confiante par rapport à mes capacités. Bien sur, ce mémoire n'aurait pas pu aboutir si je n'avais pas bénéficié d'un encadrement de qualité, de la rigueur d'une équipe soudée et du soutien de mes proches

Je tiens d'abord à remercier ma promotrice Nathalie de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de physiologie animale. Merci également pour ta familiarité, pour ton soutien ainsi que pour toutes les corrections.

Je remercie mesdames Kirschvink, Voisin, Saout et Tejerina pour leur participation à l'évaluation de ce travail.

J'adresse tout particulièrement mes remerciements à ma doctorante Anne-Emilie qui a tenu à fonder notre relation sur des bases amicales et non professionnelles dès le début du mémoire. Merci pour ton encadrement et pour ta disponibilité en toutes circonstances. Tu as toujours été là, pour moi et pour toutes les questions que j'avais à poser. Tu m'as appris à aller au bout de moi-même et à être plus attentive et plus rigoureuse au sein du laboratoire. Je te remercie également pour ta générosité et le temps que tu as consacré aux corrections et aux relectures.

Un tout grand merci également à Vanessa pour le partage de ton expérience concernant le mémoire. Merci pour tes précieux conseils, pour tes mots rassurants et bien sur, pour tout les bons moments passés ensemble. Tu nous as appris que l'on pouvait encore s'amuser en travaillant (si tu vois ce que je veux dire). Je remercie également Virginie pour sa gentillesse et sa disponibilité. Merci d'avoir été à l'écoute pour toutes mes questions et je tiens à rajouter que c'est un vrai plaisir de travailler avec quelqu'un comme toi. Merci à Inès pour ta sympathie mais aussi pour les nombreuses corrections ainsi que pour tes recommandations par rapport au mémoire. Merci à Isabelle pour son aide quotidienne et son soutien. J'apprécie tout particulièrement ta vivacité, ta personnalité, ta vision des choses et j'ajouterai qu'il est très agréable de discuter avec toi. Merci à Lucie pour sa bonne humeur et sa joie de vivre communicative et sans limites.

Ensuite, un grand merci à ma Blanche dont la présence au quotidien a contribué largement à mon bien être au sein du laboratoire. Nous avons partagé le meilleur du mémoire, de nombreux fous rires mais aussi nos coups durs et nous nous sommes mutuellement soutenues. Cette relation m'a permis entre autres de rester motivée par rapport au travail à fournir. Toute cette aventure partagée au jour le jour n'a fait qu'augmenter la grande affection déjà grande que j'avais pour toi.

Et pour terminer je tiens à remercier ma famille qui m'a écouté et soutenu durant toute année dans mes moments d'angoisse. Je remercie également Quentin qui trouve toujours les bons mots pour me donner un petit coup de boost mais aussi pour me rassurer. Finalement je remercie tous les Bios qui ont partagé avec moi ces cinq fabuleuses années d'études, probablement les meilleures années de ma vie et dont ce mémoire est l'aboutissement. J'adresse un dernier petit mot à la bande à cucul dont j'ai été et resterais particulièrement proche et à qui je peux tout confier. Recevez mes meilleurs souvenirs.

Clara

---

## Liste des abréviations

---

µg	Microgramme
µl	Microlitre
µm	Micromètre
µmol	Micromole
Acyl-CoA	Acyl-Coenzyme A
ADN	Acide désoxydibonucléique
ADNc	Acide désoxydibonucléique complémentaire
AMP	Adénosine monophosphate
ANOVA	Analysis of variance
AQP1	Aquaporine-1
ARNase	Ribonucléase
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Cre	Créatinine
CVD	Cardovascular disease
DAB	Diaminobenzidine
DFG	Débit de filtration glomérulaire
dl	Décilitre
DM	Diabetes mellitus
dNTP	Déoxyribonucléotide triphosphate
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	Endothélial Nitric Oxyde Synthase
ERO	Espèce réactive oxygénée
FF	Fraction de filtration
g	Gramme
h	Heure
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogène peroxyde
HBP	High blood pressure
HDL	High-density lipoprotein
HFD	High-Fat Diet
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horseradish
IL-6	Interleukine-6
IMC	Indice de masse corporelle
iNOS	Inductible Nitric Oxyde Synthase
IR	Insuffisance rénale
IRA	Insuffisance rénale aigue
IRC	Insuffisance rénale chronique
ISOM	Inner stripe of outer medulla
Kg	Kilogramme
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Potassium phosphate monobasic
L	Litre
L-NIL	L-N <sup>6</sup> -(1-iminoéthyl)-lysine
LDL	Low-density lipoprotein
LFD	Low-Fat Diet
m	Mètre
M	Molaire
MCP-1	Chemoattractant Protein-1

mg	Milligramme
ml	Millilitre
MLV	Murine Leucemia Virus
mm	Millimètre
mm <sup>2</sup>	Millimètre carré
MRC	Maladie rénale chronique
MRPT	Maladie rénale de phase terminale
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Hydrogénophosphate de sodium
NaCl	Chlorure de Sodium
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NEFA	Non-Esterified Fatty Acid
NEP	Neutral Endopeptidase
NF-KappaB	Nuclear Factor-kappa B
nm	Nanomètre
nM	NanoMolaire
nM	NanoMolaire
nmol	Nanomole
nNOS	Neural Nitric Oxyde Synthase
NO	Nitric Oxyde
NOS	Nitric Oxyde Synthase
NS	Non significatif
OSOM	Outer stripe of the outer medulla
PAF	Paraformaldéhyde
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PAS	Periodic acid schiff
PBS	Phosphate saline buffer
PCR	Polymerase Chain Reaction
PP2A	Protéine Phosphatase 2
RI	Résistance à l'insuline
rpm	Rotation per minute
RT	Reverse Transcriptase
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SEM	Erreur standard de la moyenne
SRA	Système Rénine-Angiotensine
SRAA	Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone
STD	Standard
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$
UACR	Urine Albumin to Creatinine Ratio
USRDS	US Renal Data System
VLDL	Very low-density lipoprotein
WHO	World Health Organization

# Table des matières

## INTRODUCTION

<b>1. Généralités sur le rein</b> .....	<b>1</b>
<b>2. L'insuffisance rénale</b> .....	<b>3</b>
<b>3. Le syndrome métabolique</b> .....	<b>4</b>
<b>4. L'obésité</b> .....	<b>8</b>
4.1 Généralités .....	8
4.2 Adipocytokines .....	9
4.3. Les maladies rénales associées à l'obésité.....	10
4.4 Mécanismes physiopathologiques sous-jacents de la glomérulopathie associée à l'obésité.....	11
4.4.1 L'hyperfiltration glomérulaire.....	12
4.4.2 Microalbuminurie .....	12
4.4.3 Expansion mésangiale .....	13
4.4.4 Augmentation de la rétention de sodium au niveau tubulaire. ....	13
4.4.5 Activation du système rénine-angiotensine (SRA) .....	13
4.4.6 Le stress oxydatif.....	14
<b>5. Le monoxyde d'azote</b> .....	<b>15</b>

## MATERIELS ET METHODES

<b>1. Groupes expérimentaux</b> .....	<b>20</b>
<b>2. Fonctions rénales et capacités excrétoires</b> .....	<b>20</b>
<b>3. Échantillons biologiques</b> .....	<b>22</b>
<b>4. Approches analytiques</b> .....	<b>22</b>
4.1 Évaluation de la fonction rénale. ....	22
4.2 Dosage de la créatinémie .....	23
4.3 Stress oxydatif.....	23
4.4 Dosage plasmatique des acides gras non-estérifiés (NEFA) .....	23
4.5 Dosage plasmatique de l'adiponectine .....	24
4.6 Dosage des Nitrites/Nitrates (NOx).....	24
<b>5. Analyses morphologiques</b> .....	<b>24</b>
5.1 Coloration au PAS (Periodic Acid Schiff), à l'Hémalum et au Bleu de Luxol .....	25
5.2 Immunohistochimie .....	25
5.2.1 Pré-traitements .....	25
5.2.2 Immunohistochimie.....	26
<b>6. Analyses des atteintes glomérulaires et structurales</b> .....	<b>26</b>
<b>7. PCR quantitative en temps réel</b> .....	<b>27</b>
7.1 Extraction de l'ARN .....	27
7.2 Transcription inverse (RT : Reverse transcription) .....	27
7.3 qPCR (Real-Time PCR).....	27
<b>8. Analyses statistiques</b> .....	<b>28</b>

## RESULTATS

<b>Partie 1. Caractérisation d'un modèle d'insuffisance rénale induite par un régime riche en graisse chez la souris C57Bl/6 .....</b>	<b>29</b>
1.1 Variation de l'augmentation relative du poids corporel (%) .....	29
1.2 Variation des valeurs de glycémie .....	29
1.3 Variation du poids des organes et données métaboliques.....	30
1.4 Variation de l'albuminurie.....	31
1.5 Evaluation de l'effet de l'obésité sur l'histologie glomérulaire .....	32
1.6 Evaluation de l'effet de l'obésité sur l'histologie tubulaire.....	34
1.7 Variation de l'excrétion urinaire en hydrogène peroxyde (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	35
1.8 Effet de l'obésité sur l'excrétion urinaire des nitrites/nitrates (NO <sub>x</sub> ) .....	36
<b>Partie 2. Effets du L-NIL sur le métabolisme du NO dans un modèle d'insuffisance rénale induite par l'obésité .....</b>	<b>37</b>
2.1 Variation de l'augmentation relative du poids corporel (%) .....	37
2.2. Variation des valeurs de glycémie .....	37
2.3 Variation du poids des organes.....	38
2.5 Variation de la concentration plasmatique en acide gras non estérifiés (NEFA) .....	40
2.6 Variation de la concentration plasmatique en adiponectine .....	40
2.7 Variation de l'albuminurie.....	40
2.8 Variation de l'excrétion urinaire en hydrogène peroxyde (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	40
2.9 Évaluation de l'effet du L-NIL sur les atteintes glomérulaires et tubulaires.....	41
2.10 Localisation et expression de la iNOS .....	43
2.11 Localisation et expression de la eNOS .....	43
2.12 Variation dans le niveau d'expression du gène codant pour la iNOS dans le tissu rénal.....	44
2.13 Variation dans le niveau d'expression du gène codant pour la eNOS dans le tissu rénal .....	44
<b>Partie 3. Étude de l'effet de la myriocine, dans un modèle d'insuffisance rénale induite par l'obésité.....</b>	<b>45</b>
3.1 Variation de l'augmentation relative du poids corporel (%) .....	45
3.2. Variation des valeurs de glycémie .....	45
3.3. Variation du poids des organes.....	48
3.4 Variation de la quantité d'eau et de nourriture ingérée .....	48
3.5 Variation de la concentration plasmatique en acides gras non estérifiés (NEFA).....	48
3.6 Variation de la concentration plasmatique en adiponectine .....	48
3.7 Variation de l'albuminurie.....	49
3.8 Évaluation de l'effet de la myriocine sur les atteintes glomérulaires .....	49
3.9 Évaluation de l'effet de la myriocine sur les atteintes tubulaires.....	50
3.10 Variation de l'excrétion urinaire en hydrogène peroxyde (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	51

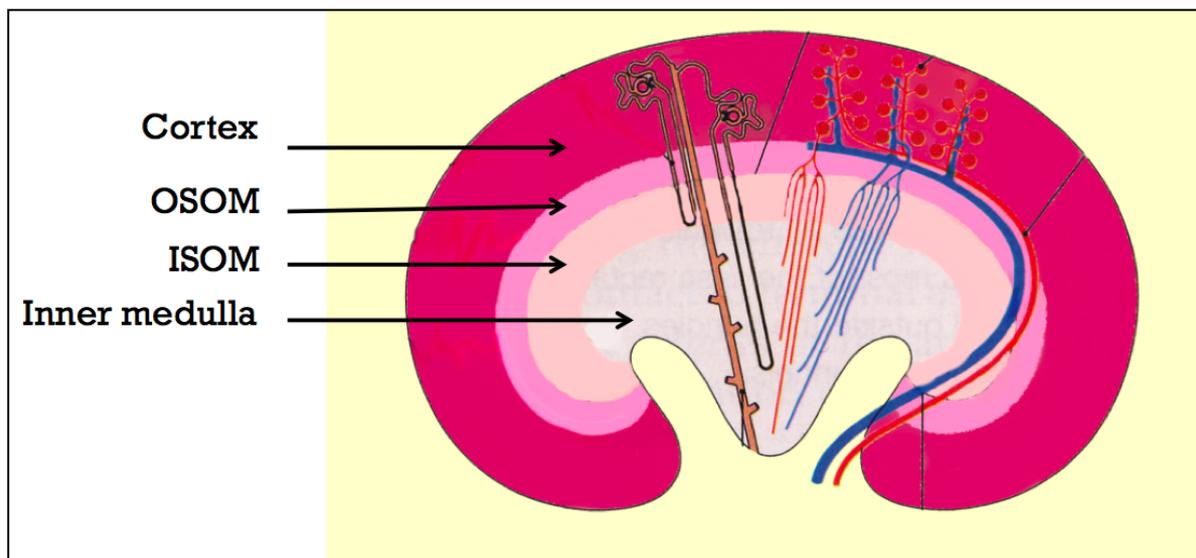
## DISCUSSION

<b>Partie 1. Caractérisation d'un modèle d'insuffisance rénale induite par un régime riche en graisse chez la souris C57Bl/6 .....</b>	<b>53</b>
<b>Partie 2. Effet du L-NIL sur le métabolisme du NO dans un modèle d'insuffisance rénale induite par l'obésité.....</b>	<b>58</b>
<b>Partie 3. Étude de l'effet de la myriocine, dans un modèle d'insuffisance rénale induite par l'obésité.....</b>	<b>60</b>

## 1. Généralités sur le rein

Le rein constitue un organe essentiel dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme et joue un rôle important dans de multiples processus physiologiques. Il assure ainsi aux cellules un environnement favorable à leur bon fonctionnement et au maintien de leurs activités.

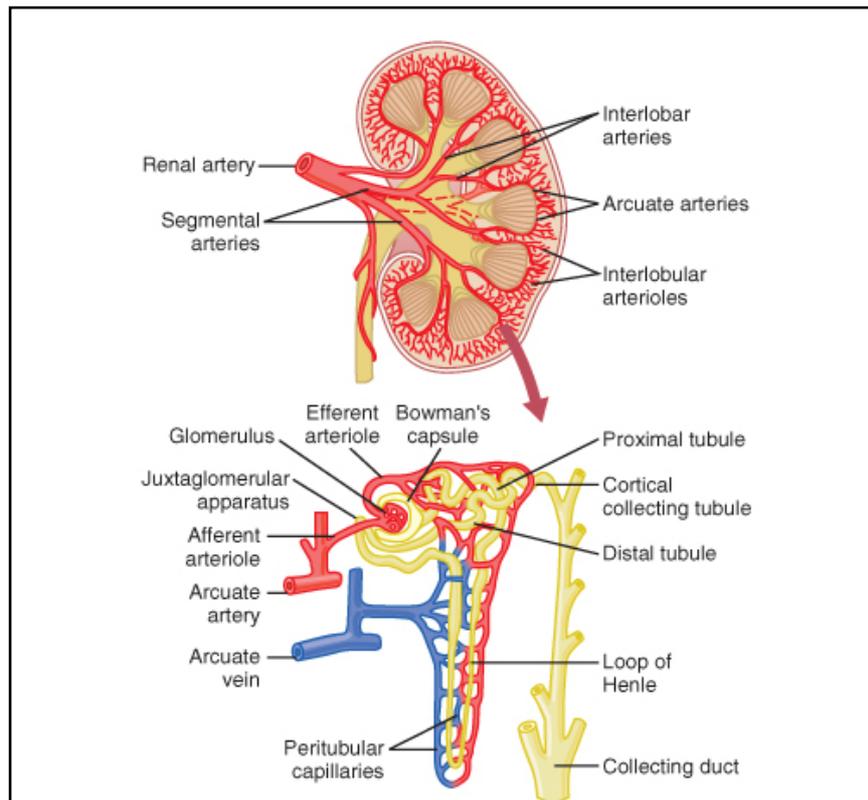
Le rein est la première voie d'élimination des déchets métaboliques tels que les déchets azotés (l'ammoniac, l'urée, l'acide urique) et les substances chimiques étrangères. Cet organe participe notamment au contrôle du volume et de la composition des fluides corporels via le maintien de l'équilibre hydro-électrolytique des liquides circulants. Il régule, entre autres, la pression artérielle, l'équilibre acido-basique, l'équilibre de l'eau et des électrolytes. Il contrôle également l'osmolarité et la concentration en électrolytes des liquides de l'organisme. Enfin, le tissu rénal joue aussi un rôle endocrinien via la sécrétion d'hormones telles que la rénine, l'érythropoïétine, l'angiotensine II ou encore la vitamine D (*Navar et, 1996*).



**Figure 1.** Schéma des différentes zones du rein (*modifié d'après Kriz & Elgar, 2003*).

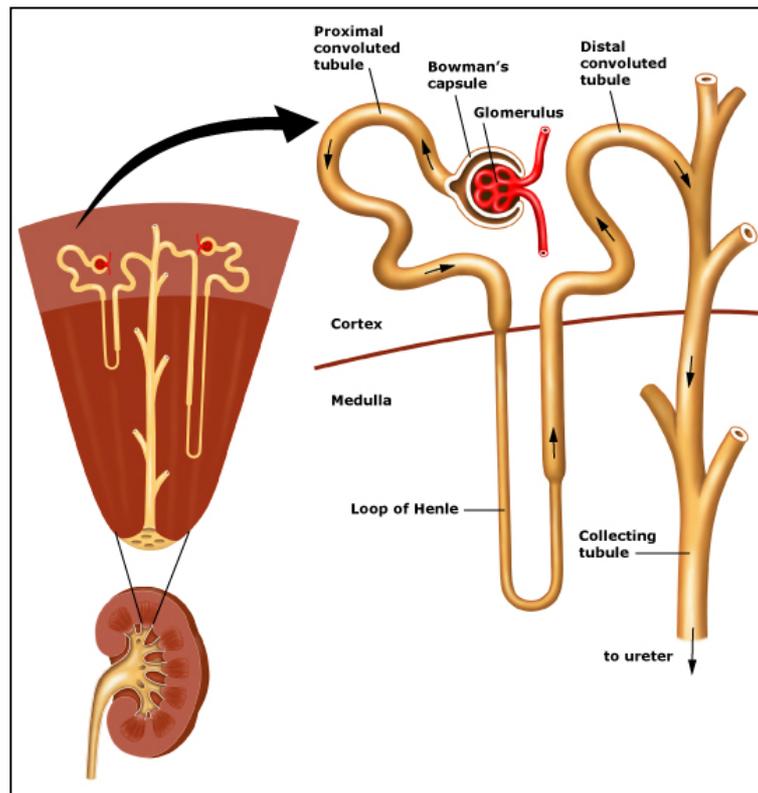
Du point de vue histologique, le parenchyme rénal est subdivisé en deux zones, le cortex et la médullaire. Cette dernière est elle-même subdivisée en 3 couches concentriques ; la partie externe de la médullaire externe (Outer Stripe of the Outer Medulla ou OSOM), la partie interne de la médullaire externe (Inner Stripe of the Outer Medulla ou ISOM) et enfin, la médullaire interne (Figure 1).

Sur le plan vasculaire, les reins reçoivent 20 à 25 % du débit cardiaque afin de pouvoir assurer de manière optimale toutes leurs fonctions. Le sang oxygéné perfuse le rein via l'artère rénale qui se subdivise successivement en artères interlobaires, interlobulaires et arquées se ramifiant en artéioles dans la zone corticale. Chacune des artéioles afférentes rejoint le glomérule où a lieu l'ultrafiltration. Le réseau dense de capillaires glomérulaires est drainé par l'artéiole efférente qui débouche ensuite sur des capillaires péri-tubulaires qui entourent l'anse de Henle au sein de la médullaire (Figure 2). Le sang des capillaires péri-tubulaires s'écoule alors dans des veinules se drainant successivement dans de petites veines. Le sang rejoint finalement la veine cave inférieure via la veine rénale.



**Figure 2.** Section d'un rein humain montrant les principales subdivisions de l'artère rénale et de la microcirculation de chaque néphron. *D'après Guyton & Hall (2005).*

Toutes les fonctions rénales décrites précédemment sont en parties assurées grâce à une filtration du plasma par les néphrons. Chez l'homme, chaque rein contient approximativement un million de néphrons. Le néphron constitue l'unité fonctionnelle de base du système rénal et est constitué de l'association morphologique et fonctionnelle d'un réseau vasculaire dense et d'un système tubulaire parcourant le cortex et la médullaire. L'ultrafiltration sélective du plasma a lieu au sein du glomérule, lequel correspond à la partie terminale du néphron situé dans le cortex et constitué d'un peloton de capillaires. L'urine primitive est récoltée dans une structure creuse qui englobe le glomérule, la capsule de Bowman. Cette urine primitive subit par la suite de nombreux phénomènes de réabsorption sélective et de sécrétion de solutés au cours de son passage dans le système tubulaire. L'urine passe premièrement dans le tubule proximal, en connexion avec la capsule de Bowman, puis traverse l'anse de Henlé, une structure en épingle à cheveux constituée d'une branche descendante qui pénètre en profondeur dans la médullaire et d'une branche ascendante qui rejoint le tubule distal situé dans le cortex. Ces différents segments tubulaires sont fonctionnellement et structurellement distincts. L'urine finale rejoint alors le tube collecteur de Bellini qui passe de la région corticale dans la médullaire pour atteindre le bassinnet (Figure 3).



**Figure 3.** Structure anatomique d'un néphron chez l'homme (<http://www.calcuttayellowpages.com/adver/109177kidney.html>).

Au vu des rôles essentiels du rein, l'importance du maintien des fonctions rénales est indispensable au maintien de l'homéostasie de l'organisme. La perte de ces fonctions s'avère très néfaste et entraîne des dommages morpho-fonctionnels irréversibles ce qui compromet fortement le pronostic vital des personnes présentant ces altérations.

## 2. L'insuffisance rénale

L'insuffisance rénale (IR) résulte de la dégradation progressive ou ponctuelle des fonctions rénales et représente une cause importante de morbidité et de mortalité dans le monde entier (Koide & Ichikawa, 1996). Cette maladie se traduit par un ensemble de manifestations cliniques et biologiques occasionnées par une incapacité des reins à épurer le plasma sanguin, ce qui donne lieu au syndrome urémique. Les reins échouent dans le rôle de maintien de l'équilibre hydro-électrolytique et acido-basique des fluides corporels. Les organes n'arrivent plus à réguler le volume extracellulaire ni à éliminer les toxines, l'eau, les produits du métabolisme de manière appropriée. Ces derniers s'accumulent dans le sang et dans les fluides extracellulaires sous forme de déchets azotés (hyperazotémie), d'urée ou encore de créatinine. Ce déclin des fonctions rénales se traduit généralement par une diminution du débit de filtration glomérulaire (DFG). D'un point de vue clinique, l'IR est caractérisée par une diminution de l'osmolarité urinaire, une polyurie ainsi qu'une créatininémie élevée (Lewis, 2011). Les causes d'IR sont multiples, elle peut être due à un trauma mécanique, à des infections répétées, à une irrigation insuffisante des cellules tubulaires ou encore à une intoxication aux métaux lourds ou à des solvants organiques. Les troubles caractéristiques de l'IR n'apparaissent qu'une fois que le rein a perdu 75 % de ses fonctions. Actuellement, le nombre de patients souffrant d'une IR est en constante augmentation et la maladie pose de vrais problèmes de santé publique. L'IR peut être caractérisée soit d'aiguë, (IRA), soit de chronique (IRC). Elle est généralement décrite

en 5 niveaux basés sur la présence de dommages rénaux bien identifiés et sur la mesure du DFG (*Ruan & Guan, 2009*). Lorsque l'IR atteint le stade 5, l'état du patient nécessite le recours à une dialyse ou à une transplantation.

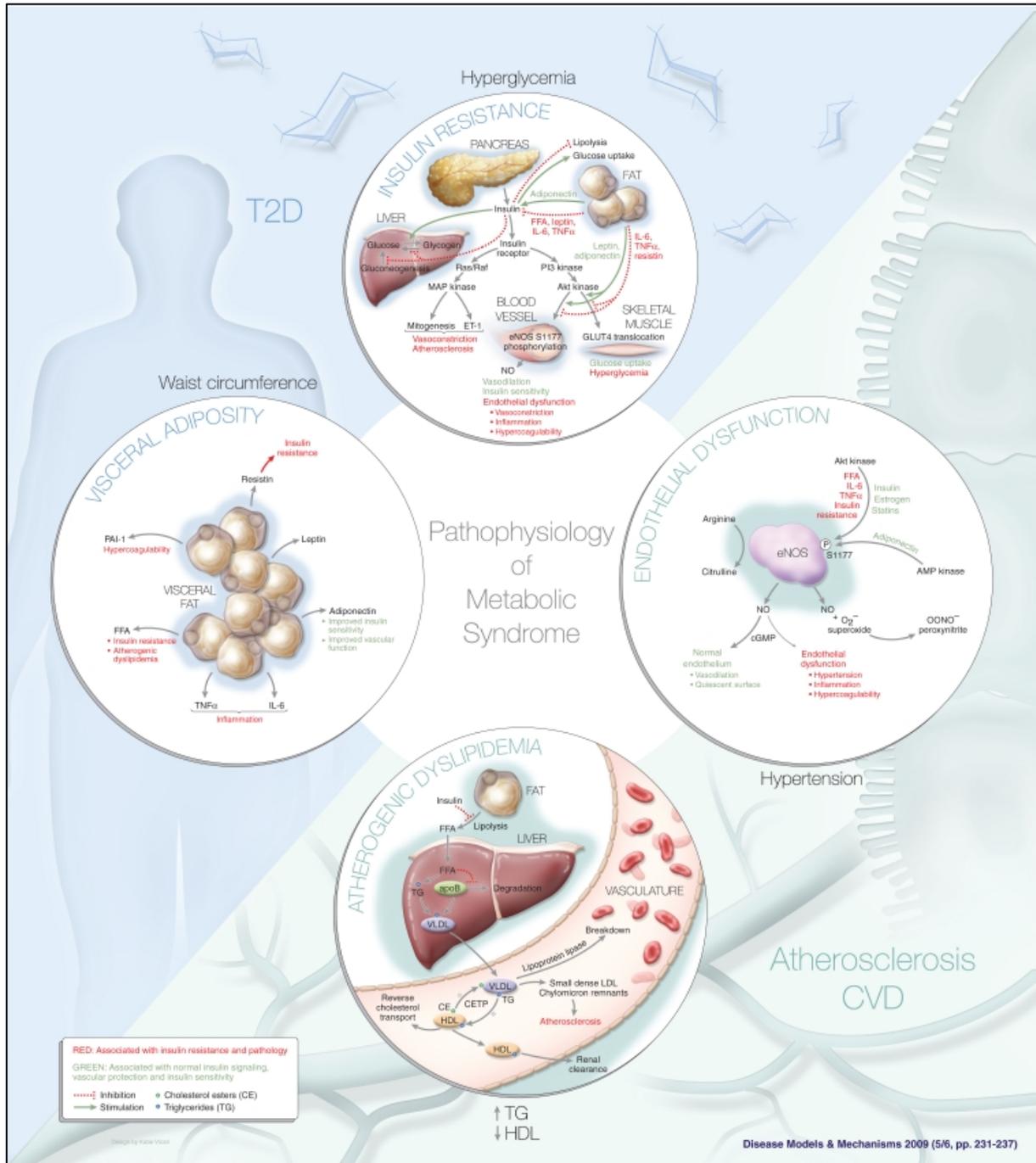
L'IR aiguë correspond à un syndrome caractérisé par un arrêt brutal (en heures ou en jours) de la fonction rénale. Le niveau de défaillance de l'organe peut atteindre un pic mais la dégradation des fonctions rénales reste réversible et l'éventualité d'une récupération est possible. Malgré tout, le système est fragilisé pour une durée significative et sera plus facilement sujet au développement d'autres maladies rénales (*Jacob, 2007*).

L'IR chronique est définie par la perte progressive du parenchyme rénal fonctionnel qui, sur le long terme, peut aboutir à l'IR au stade terminal. Dans ce cas, les dommages sont irréversibles et les reins deviennent totalement inaptes à filtrer le sang et à produire de l'urine. Lorsque la fonction rénale n'atteint plus que 10 % de ses capacités d'origine, les seules interventions envisageables sont la dialyse ou la transplantation du rein. L'IRC peut être causée par plusieurs troubles, tels que des lésions vasculaires rénales (athérosclérose), des désordres immunologiques (glomérulonéphrite), des infections, des lésions tubulaires primaires, une obstruction des voies urinaires, ainsi que par des maladies métaboliques telles que le diabète, et l'obésité (*Lewis, 2011*). Dans le cadre de ce mémoire, nous nous sommes intéressés à l'IRC associée au syndrome métabolique.

### **3. Le syndrome métabolique**

---

Le syndrome métabolique fait référence à un syndrome clinique complexe rassemblant un ensemble d'anomalies métaboliques associées et co-occurentes. Ce syndrome fut premièrement décrit par Reaven en 1988 (*Reaven, 1988*). Par la suite, plusieurs définitions ont été proposées pour établir les critères diagnostiques permettant de définir les patients atteints du syndrome (*National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III, World Health Organization, American Association of Clinical Endocrinologists*) (*Beilby, 2004 ; Ruan & Guan, 2009*). Bien que ces définitions soient toujours sujettes à des controverses, 4 principales caractéristiques cliniques sont retenues, à savoir, la résistance à l'insuline, l'hypertension, la dyslipidémie et l'obésité. Ces conditions partagent de nombreuses voies signalétiques ainsi que des médiateurs métaboliques communs. Le syndrome est généralement accompagné d'une hyperinsulinémie, d'un niveau plasmatique élevé en Very Low-Density Lipoprotein (VLDL) et d'un faible niveau plasmatique pour les High-Density Lipoprotein (HDL) (*Ruan & Guan, 2009*). Le syndrome métabolique permet d'identifier les personnes fortement sujettes au développement de maladies cardiovasculaires et au diabète de type 2. Le syndrome peut être décrit en 4 caractéristiques : la résistance à l'insuline, le dysfonctionnement endothélial, la dyslipidémie athérogénique et l'adiposité viscérale (*Huang, 2009*).



**Figure 4.** Les quatre principaux éléments du syndrome métabolique (Huang, 2009).

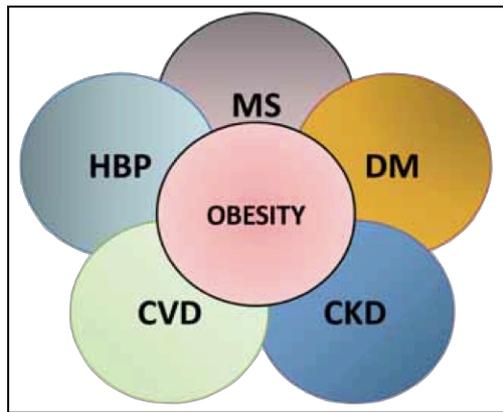
La résistance à l'insuline (RI) est établie lorsque les muscles, le foie et le tissu adipeux qui sont les principaux tissus consommateurs du glucose présent dans le sang, n'arrivent plus à utiliser cette molécule de manière appropriée en réponse à une libération d'insuline par le pancréas. La conséquence de cette diminution de la sensibilité à l'insuline par les tissus périphériques est l'augmentation de la concentration plasmatiques en glucose (hyperglycémie) et de l'insuline (hyperinsulinémie) et peut ainsi induire un diabète de type 2. De plus, la dérégulation des mécanismes de feedback exacerbe les physiopathologies liées à la RI (Huang, 2009).

La dyslipidémie athérogénique est caractérisée par une augmentation et une accumulation d'acides gras libres dans le sang. Cette condition est associée à des niveaux

plasmatiques élevés de triglycérides, d'Apo lipoprotéine B, de petites lipoprotéines de faible densité (LDL) et des lipoprotéines de très faible densité (VLDL), tandis que ceux des lipoprotéines de haute densité (HDL) sont faibles (*Grundy, 2004*). Les VLDL sont des structures transportant des triglycérides en association avec des apolipoprotéines spécifiques, mais aussi du cholestérol et des cholesteryls esters. Ces triglycérides peuvent provenir d'acides gras ou d'hydrates de carbone en excès dans l'alimentation et qui ne sont pas directement utilisés comme substrat énergétique (*Lehninger, 2008*). Les HDL sont des petites particules riches en protéines formées par le tissu extrahépatique et transportant des cholestérols mais pas de cholestérol esters (*Lehninger, 2008*). La RI participe à la progression de la dyslipidémie en induisant une lipolyse continue dans les adipocytes, libérant des acides gras libres dans la circulation. La lipotoxicité apparaît lorsque la concentration sanguine des lipides (principalement des acides gras omega-6) atteint un niveau critique. Les lipides circulant dans le sang, particulièrement les LDL, deviennent toxiques pour les cellules endothéliales et accélèrent la progression des plaques d'athérome. Ces lipides peuvent aussi atteindre d'autres cellules et d'autres organes via la circulation sanguine où ils vont induire de nombreux dommages.

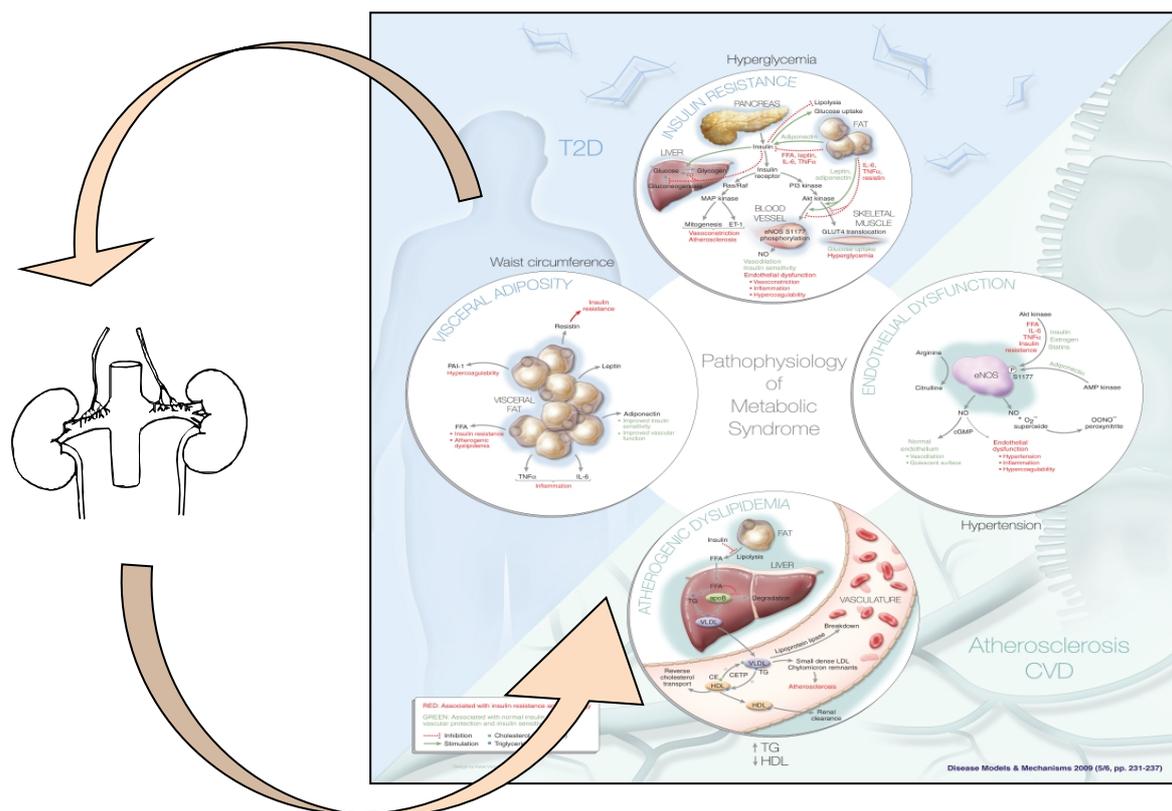
Le dysfonctionnement endothélial rassemble et décrit de multiples anomalies structurelles et fonctionnelles se développant au niveau des cellules endothéliales. Les cellules endothéliales sont connectées via des structures complexes et constituent une barrière séparant les tissus interstitiels de l'espace intravasculaire. Ce tissu a pour principal rôle le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire (*Avogaro & Vigili de Kreutzenberg, 2005*). Ces cellules assurent de nombreuses fonctions physiologiques via la régulation du remodelage vasculaire, de l'inflammation, de l'hémodynamique, des processus prothrombogéniques, et antithrombogéniques (*Goligorsky et al., 2001*). L'endothélium est aujourd'hui considéré comme un organe à part entière. Suite à certains stress tels que l'hyperglycémie, le stress oxydatif, la présence d'acides gras libres, de cytokines pro-inflammatoires, ou d'adipokines, l'endothélium peut être endommagé et ne plus être capable d'accomplir ses fonctions. Or toutes ces conditions sont rencontrées dans le syndrome métabolique. Cette dysfonction a pour résultat une augmentation de la perméabilité de l'endothélium et une accélération de la formation naturelle de plaques d'athérome. Le dysfonctionnement endothélial est généralement accompagné d'une diminution de la disponibilité en monoxyde d'azote (NO) (*Avogaro & Vigili de Kreutzenberg, 2005 ; Baylis, 2008 ; Zhao et al., 2006*).

L'adiposité viscérale ou obésité viscérale correspond à l'accumulation de tissu adipeux blanc. L'augmentation de la prévalence du syndrome métabolique est majoritairement due à l'augmentation en parallèle de la prévalence de l'obésité. Le syndrome métabolique et l'obésité sont connus pour être de puissants facteurs de risque dans le développement de nombreuses maladies notamment l'athérosclérose, l'hypertension artérielle, certaines formes de cancers (colon, prostate, sein, endométrium) mais surtout pour les maladies cardiovasculaires et le diabète mellitus (*Eknoyan, 2011 ; Lehninger, 2008 ; Pi-Sunyer, 2009*) (Figure 5).



**Figure 5.** L'obésité constitue un facteur de risque dans le développement de nombreuses maladies. MS : metabolic syndrome ; HBP : high blood pressure ; DM : Diabetes mellitus ; CVD : cardiovascular disease ; CKD : chronic kidney disease. (D'après *Eknoyan, 2011*).

Ces dernières années, l'implication d'un excès de tissu adipeux dans l'apparition et l'accélération des maladies rénales chroniques (MRC) à attiré l'attention de nombreux scientifiques qui soulignèrent des corrélations positives entre les deux pathologies. Dans le cadre de ce mémoire, nous avons étudié l'impact du syndrome métabolique, et plus spécifiquement celui de l'obésité, sur la fonction rénale, afin de déterminer s'ils peuvent constituer un organe clé dans la progression de la pathologie (Figure 6).



**Figure 6.** Le rein constitue-t-il un organe clé dans le développement de l'obésité ? (modifié d'après *Huang, 2009*).

## 4. L'obésité

---

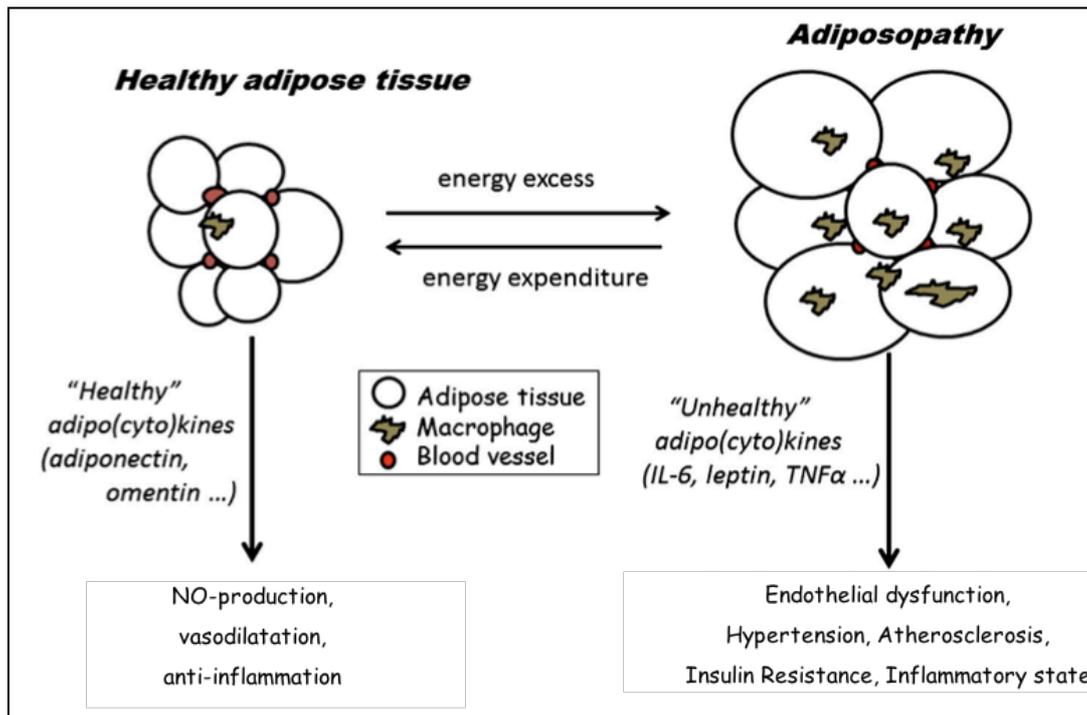
### 4.1 Généralités

---

Avant le 19<sup>ème</sup> siècle, avoir une forte corpulence était considéré comme un signe de bonne santé. Depuis le début du 20<sup>ème</sup> siècle, les bénéfices relatifs au surpoids furent reconsidérés et le terme d'obésité a progressivement fait son apparition dans la littérature, apportant avec lui des preuves irréfutables qu'un excès de graisse est néfaste pour la santé (*Eknoyan, 2006*). La prévalence de l'obésité a augmentée de manière dramatique ces vingt dernières années, touchant aussi bien les femmes que les hommes ainsi que toutes les classes d'âges, particulièrement les enfants et les adolescents (*Flegal et al., 2010*). Chez les adultes âgés entre 20 et 74 ans cette prévalence a doublé, passant de 15 % à 30 % (*Flegal et al., 2002*). En 2008, l'organisation mondiale de la santé estima que 1,4 milliard et 300 millions de personnes souffraient respectivement de surpoids (soit 35 % de la population adulte) et d'obésité (soit 12 % de la population adulte). De plus, 40 millions d'enfants âgés de moins de cinq ans furent estimés être en surpoids au cours de la même année. Avec ce constat alarmant, l'obésité fut qualifiée de maladie épidémique, particulièrement dans les pays développés. La pathologie est devenue un réel problème de santé publique et la prise en charge des soins représente un véritable fardeau économique pour les gouvernements des pays touchés (*Misra & Khurana, 2008*).

L'obésité est une maladie métabolique caractérisée par un excès de tissu adipeux blanc et une accumulation anormale de lipides au sein et autour d'organes clés entraînant une altération du métabolisme cellulaire et un état d'inflammation chronique. Le degré d'accumulation de graisse corporelle est estimé à partir de l'indice de masse corporelle (IMC) calculée en  $(\text{poids en kg})/(\text{taille en m})^2$ . Une personne est considérée comme obèse une fois qu'elle a atteint un IMC de plus de 30 kg/m<sup>2</sup> (*WHO, 1998*). La pathologie est la conséquence naturelle d'un mode de vie sédentaire, favorisant l'inactivité physique et basée sur un régime alimentaire occidental riche en acides gras saturés et contenant plus de calories que celles dépensées par l'organisme (*Lenhinger, 2008 ; Misra & Khurana, 2008*). Les conséquences directes de la pathologie sont une mortalité, une morbidité cardiovasculaires élevées ainsi qu'une réduction de l'espérance de vie.

Le tissu adipeux blanc fut longtemps considéré comme un simple lieu de stockage passif, mais il est aussi un important organe endocrinien régulant de multiples processus physiologiques et influençant la fonctionnalité de nombreux organes via ses sécrétions (*Wiecek et al., 2003*). En effet, le tissu produit et sécrète des substances biologiques actives appelée adipo(cyto)kines et pouvant agir de manière locale ou systémique (*Adamczak et al., 2013 ; Chudek et al., 2006 ; Lehninger, 2008*). L'obésité entraîne progressivement la détérioration des fonctions du tissu adipeux se traduisant par une sécrétion anormale de ces adipokines (*Johan van de voorde et al., 2013*). Cette dérégulation de la fonction endocrine du tissu fait suite à l'hypoxie et au trauma mécanique engendrés par l'hypertrophie et l'hyperplasie du tissu, mais aussi au stress oxydatif et à l'état chronique d'inflammation associé à l'obésité (*Adamczak et al., 2013 ; Kim et al., 2005 ; Skurk et al., 2007*). L'excrétion excessive d'adipokines est reconnue depuis longtemps comme étant un facteur clé dans la progression des processus pathologiques associés à l'obésité (*Matsuzawa, 2006*). Le processus durant lequel le tissu adipeux sain bascule vers un tissu adipeux dont les fonctions sont altérées s'appelle l'adisopathie (*Kim et al., 2005*). Cette adisopathie est accompagnée d'un changement de profil de la sécrétion des adipokines, d'un dysfonctionnement cardiovasculaire et d'une infiltration des cellules de l'inflammation telles que les macrophages au sein du tissu (*Van de voorde et al., 2013 ; Weisberg et al., 2003*) (Figure 6).



**Figure 7.** Schéma de la conversion du tissu adipeux sain en un tissu adipeux dérégulé produisant des adipokines ayant des effets néfastes pour le système cardiovasculaire. (Modifié d'après Van de voorde et al, 2013).

Une fois que le processus de prolifération des cellules adipeuses n'arrive plus à fournir l'espace nécessaire au stockage des lipides, la graisse s'accumule au niveau des autres organes dans des sites dits « ectopiques », notamment autour des viscères, du cœur, de la vasculature et du rein (Heilbronn, et al., 2004). Cette graisse qui s'étend aux organes périphériques lorsque le tissu adipeux a atteint sa capacité maximale de stockage s'appelle graisse ectopique. Elle entraîne une RI, particulièrement dans le foie et dans les muscles et participe à l'inflammation chronique associée à l'obésité via la sécrétion d'adipo(cyto)kines (Bruce & Byrne, 2009).

## 4.2 Adipocytokines

Les adipo(cyto)kines sur-régulées dans l'obésité comprennent la résistine, l'interleukine-6 (IL-6), le facteur  $\alpha$  de nécrose tumorale (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  : TNF- $\alpha$ ), la protéine chimiotactique monocytaire-1 (monocyte chemoattractant protein : MCP-1), la visfatine, la vaspine, la lipocalin-2, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (plasminogen activator inhibitor-1 : PA-1) ainsi que la leptine (Johan van de voorde et al., 2013).

La leptine est une hormone peptidique qui interagit avec le système nerveux central pour diminuer l'appétit en limitant la prise de nourriture et en stimulant la consommation d'énergie par l'organisme (Cowley et al, 2001). Elle participe ainsi à long terme au maintien d'un poids stable. Il a été démontré que le taux de sécrétion et que la concentration plasmatique de la leptine sont plus élevés chez les patients obèses (hyperleptinémie). Des souris étant mutées pour le gène de la leptine développent une obésité associée à de l'hyperinsulémie et une hypertriglycéridémie (Laville, 2001). La théorie de résistance à la leptine propose une explication à ce constat. Celle-ci suggère que les patients atteints d'obésité ont développé une résistance à la leptine, provoquant une perte de la sensation de satiété et par conséquent une prise non contrôlée de nourriture. Néanmoins la leptine continue à être délivrée dans la circulation, atteignant des taux très élevés (Martin et al., 2008). La leptine participe à de nombreux

processus pathologiques associés à l'obésité. Elle contribue notamment à l'augmentation de la sécrétion d'adipo(cyto)kines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 par le tissu adipeux blanc (Bullo *et al.*, 2003). L'hormone promeut le développement de l'hypertension via l'induction d'une hyperactivité sympathique (Adamczak & Wiecek, 2013). Il a été démontré que la leptine induit la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) au sein des cellules endothéliales mises en culture et que, par conséquent, elle jouerait un rôle clé dans le stress oxydatif lequel occasionne des altérations de la fonction endothéliale (Bouloumie *et al.*, 1999). Au niveau rénal, la leptine participe à l'apparition de lésions rénales associées aux MRC, notamment via ses effets pro-inflammatoires et pro-oxydants (Zoccali, 2009). Des patients atteints de MRC montrent des niveaux plasmatiques très élevés pour cette hormone (Heimbürger *et al.*, 1997). Il a été démontré que chez des souris surexprimant la leptine, l'apparition de maladies rénales était plus précoce (Adamczak & Wiecek, 2013).

Bien que de nombreuses adipokines soient surexprimées dans l'obésité, certaines telles que l'adiponectine sont dérégulées et se retrouvent en très faible concentration dans le sang par rapport aux conditions physiologiques. L'adiponectine est une hormone peptidique bien connue pour ses propriétés anti-inflammatoires, notamment via la suppression de la sécrétion de TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 par les macrophages, anti-athérogéniques et insulino-sensibles (Adamczak & Wiecek, 2013 ; Kershaw & Flier, 2004 ; Lehninger, 2008). En limitant l'adhésion des monocytes aux parois vasculaires, l'adiponectine prévient la formation de plaques d'athérome (Kershaw & Flier, 2004). L'hormone affecte également fortement le métabolisme des acides gras et des carbohydrates. En effet, elle stimule la prise des acides gras par les muscles et leur  $\beta$ -oxydation, inhibe leur synthèse et la gluconéogenèse dans les hépatocytes et améliore le catabolisme du glucose dans les muscles et le foie (Lehninger, 2008). Par conséquent l'hypo adiponectémie est généralement accompagnée d'une dyslipidémie et d'une hyperinsulémie (Avogaro & Vigili de Kreutzenberg, 2005). Dans de nombreux types cellulaires dont les cellules endothéliales, l'adiponectine supprime la génération d'ERO néfaste pour le système vasculaire (Sharma, 2009 ; Tao *et al.*, 2007). Nous verrons plus tard qu'elle possède également des effets protecteurs sur le système rénal.

L'obésité est une maladie inflammatoire chronique. En effet, le tissu adipeux est une source importante de médiateurs-clés de l'inflammation tels que l'IL-6 produit par les adipocytes ou le TNF- $\alpha$  produit par les macrophages infiltrés (Kershaw & Flier, 2004). Leur production est stimulée dans l'obésité et est associée au dysfonctionnement endothélial et à une modification du métabolisme du glucose (Laville, 2001 ; Yudkin, 2003). Ces cytokines pourraient également altérer le processus de lipolyse en interférant avec l'action de l'insuline.

Le monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) est une chémokine importante pour le recrutement des macrophages au niveau des sites de l'inflammation comme les plaques d'athérome (Bursil *et al.*, 2004). Et comme les autres adipocytokines pro-inflammatoires, sa production par le tissu adipeux est augmentée dans l'obésité (Sartipy *et al.*, 2003). Cette protéine serait responsable notamment de l'infiltration des macrophages au sein du tissu adipeux et de la libération subséquente de cytokines par ces cellules. La sensibilité des adipocytes à l'insuline est également altérée par la MCP-1 (Sartipy *et al.*, 2003). Notons que la protéine est produite non seulement par les adipocytes mais aussi par de nombreuses cellules mésenchymateuses, notamment au niveau des glomérules (Giunti *et al.*, 2007). L'expression de cette chémokine est inhibée par le NO, prévenant l'adhésion des leucocytes au niveau des parois vasculaires (Forstermann & Sessa, 2012).

### **4.3. Les maladies rénales associées à l'obésité**

---

Il semblerait que la capacité des adipokines à affecter de manière directe le système rénal pourrait représenter une base mécanistique importante dans les MRC touchant les patients

atteints d'obésité. En effet, l'implication de l'obésité et du surpoids dans les maladies rénales fut peu prité en considération jusqu'à ces dernières années. Cependant, avec l'augmentation sévère de glomérulopathies associées à l'obésité, l'excès de tissu adipeux semble de plus en plus constituer un facteur de risque important dans le développement de maladies rénales. Les changements hormonaux et métaboliques provoqués par le syndrome métabolique peuvent altérer la fonction rénale jusqu'à entraîner la maladie rénale de phase terminale (MRPT), et ce, indépendamment de l'hypertension et du diabète concomitants (*Amann and Benz, 2013; Cignarelli and Lamacchia, 2007; Eknayan, 2011; Iseki et al., 2004*). Il a été démontré que les individus en surpoids ont un risque plus élevé de développer une MRC par rapport aux individus de poids normal (*Wang et al., 2008*). L'augmentation du nombre de patients traités par dialyse ou par transplantation aux Etats-Unis est concomitante à la hausse de la prévalence de l'obésité au sein de la population (*Eknayan, 2011*). L'obésité n'induit pas seulement des dysfonctionnements rénaux, mais aggrave et accélère également la progression de maladies rénales préexistantes telles que la glomérulonéphrite ou les maladies rénales liées à l'âge ou faisant suite à une transplantation ou une néphrectomie (*Gonzalez et al., 2005; Laville, 2011; Meier-Kriesche et al., 2002*). Avec les cas de diabète et d'hypertension, l'obésité représentait approximativement 70 % des causes de MRPT aux Etats-Unis en 2005 (USRDS 2005).

Les maladies rénales chroniques rassemblent un ensemble d'altérations hémodynamiques, fonctionnelles et structurelles pouvant entraîner la défaillance rénale et se traduisant dans la durée par une MRPT. Ces maladies sont associées à un risque accru de développer des maladies cardiovasculaires et à une mortalité élevée (*Ruan & Guan, 2009*). Les altérations structurelles observées dans les néphropathies associées à l'obésité ont été largement décrites dans des études expérimentales réalisées *in vivo* et *in vitro*. Les modifications structurelles comprennent une augmentation du poids des reins, une expansion de la matrice mésangiale, une hypertrophie glomérulaire associée à une glomérulosclérose, un épaissement de la membrane basale glomérulaire, un détachement progressif des podocytes, une fibrose interstitielle graduelle, une atrophie tubulaire, et un dysfonctionnement endothélial (*Declèves et al., 2011; Goumenos et al., 2009; Gröne et al., 1989; Kalaitzidis et al., 2011; Kambham et al., 2001; Pai et al., 1995; Rovin and Tan, 1993; Roh et al., 1998; Serra et al., 2008; Wu et al., 2006*). Les atteintes fonctionnelles sont généralement caractérisées par une protéinurie et une albuminurie élevée (*Goumenos et al., 2009; Kowar et al., 2009*), une augmentation de la rétention de sodium au niveau tubulaire (*Rocchini et al., 1989*), ainsi qu'une hyperfiltration glomérulaire (*Chagnac et al., 2000; Goumenos et al., 2009; Kambham et al., 2001*).

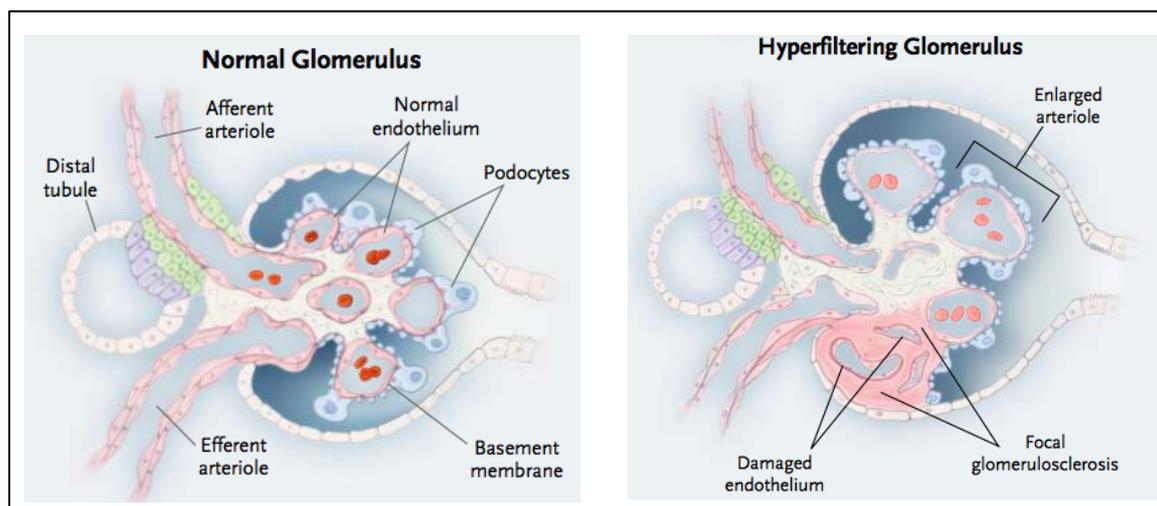
#### **4.4 Mécanismes physiopathologiques sous-jacents de la glomérulopathie associée à l'obésité**

---

De nombreux candidats ou processus se sont avérés être impliqués dans ces changements pathologiques tels que l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA), l'implication de la leptine, de l'adiponectine et des autres adipokines, l'hyperinsulinémie, le stress oxydatif, les modifications inflammatoires ainsi que des changements hormonaux (*Eknayan 2011; Laville, 2011; Rüster & Wolf, 2013; Slee, 2012*). Comprendre les mécanismes physiopathologiques sous-jacents de ces perturbations fonctionnelles est essentiel pour le développement d'alternatives thérapeutiques.

#### 4.4.1 L'hyperfiltration glomérulaire

Une augmentation significative du DFG ainsi qu'une hausse du flux sanguin sont observées chez des sujets obèses (incluant les individus non-diabétiques) et dans des modèles animaux d'obésité (Chagnac *et al.*, 2000; Goumenos *et al.*, 2009; Kambham *et al.*, 2001). Il a été montré que l'hypertrophie glomérulaire chez des individus obèses est proportionnelle à l'IMC (Goumenos *et al.*, 2009). Des patients atteints de syndrome métabolique présentent notamment un DFG deux fois plus élevé par comparaison à des individus sains (Li *et al.*, 2011). L'hyperfiltration ainsi que l'hypertrophie glomérulaire sont la résultante des besoins métaboliques exigés par un excès pondéral et se traduisent par une glomérulosclérose évolutive (Griffin, 2007). En effet, la surface glomérulaire peut être augmentée jusqu'à 50 % dans l'obésité (Laville, 2011). Ces anomalies se développent de manière similaire à celles faisant suite à une diminution du nombre de néphrons ou une augmentation de la pression intraglomérulaire (Hostetter *et al.*, 1981). En effet, il a été démontré que l'obésité est associée à une réduction du nombre de néphrons. L'hyperfiltration est un mécanisme adaptatif visant à maintenir un taux de filtration global constant après la perte de glomérules fonctionnels, ce qui entraîne une augmentation de la pression capillaire intraglomérulaire (Brenner, 1988; Brenner, 1996). Cette adaptation devient graduellement mal adaptée et entraîne diverses altérations glomérulaires décrites précédemment incluant une sclérose glomérulaire segmentaire, puis globale, une expansion de la matrice mésangiale, des capillaires dilatés et un dysfonctionnement des podocytes (Amann & Benz, 2013, Helal *et al.*, 2012 ; Ingelfinger, 2003) (Figure 8). L'hyperfiltration peut apparaître suite à une dilatation de l'artériole afférente, après une constriction de l'artériole efférente ou les deux. Une forte activité sympathique, mais aussi l'action de l'angiotensine II et l'hyperinsulinémie peuvent contribuer à l'apparition de ces deux conditions (Zoccali, 2009).



**Figure 8 :** Impact de l'augmentation de la pression intraglomérulaire sur l'histologie du glomérule (d'après Ingelfinger, 2003).

#### 4.4.2 Microalbuminurie

L'augmentation du DFG est généralement suivie d'une albuminurie, soit, d'une augmentation de l'excrétion d'albumine dans les urines ce qui traduit une augmentation de la perméabilité vasculaire et un effacement des podocytes. Ces deux conditions sont corrélées à une diminution de la concentration plasmatiques en adiponectine dans l'obésité (Sharma, 2009). Le dysfonctionnement des podocytes peut provenir d'une augmentation de l'activité de la NADPH oxydase rénale libérant une grande quantité de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )

(Sharma, 2009). Ces altérations peuvent ultérieurement donner lieu au dysfonctionnement endothélial. L'albuminurie est généralement l'indication clinique la plus précoce d'une altération de la fonction rénale et le signe d'un risque élevé de développements des maladies cardiovasculaires (de Zeeuw et al., 2006 ; Ninomiya et al., 2009 ; Ruggenenti et al., 2004). Elle est généralement fortement associée au diabète de type 2 avec l'hypertension.

#### **4.4.3 Expansion mésangiale**

Une expansion de la matrice mésangiale accompagnée d'un épaissement de la membrane basale du glomérule est quasiment toujours retrouvée parmi les anomalies rénales associées à l'obésité. Cette expansion est associée à une activation des cellules mésangiales qui vont produire de manière excessive de la matrice extracellulaire comprenant du collagène I et IV, de la fibronectine, de la laminine et des glycosaminoglycans sulfatés (Lee, 2011). Ces cellules s'activent en réponse à différents stimuli associés à l'obésité tels que l'hyperglycémie ou la présence de cytokines incluant le TGF- $\beta$  et le MCP-1. En effet, en réponse à une forte concentration en glucose, les cellules mésangiales produisent du collagène, du TGF- $\beta$  ainsi que du MCP-1 et les podocytes du TGF- $\beta$  (Ha et al., 2002 ; Sharma and Ziyadeh, 1994). Le glucose induit la sécrétion de matrice mésangiales via une activation de la voie NF- $\kappa$ B dans les cellules mésangiales (Ha et al., 2002). Le MCP-1 produit par ces cellules induit ultérieurement la production de fibronectine, de collagène I et IV chez les cellules mésangiales (Giunti et al., 2008; Park et al., 2008). Le mécanisme pathogénique responsable de l'hyperactivité des cellules mésangiales chez des sujets obèses semblerait également impliquer d'autres acteurs: les VLDL, les LDL, les LDL oxydés ainsi que l'angiotensine II. En effet, Les VLDL et les LDL induisent la prolifération cellulaire des cellules mésangiales et les LDL oxydés promeuvent la production de MCP-1 par ces cellules. Finalement, l'angiotensine II induit la production de TGF- $\beta$  et de collagène par ces mêmes cellules.

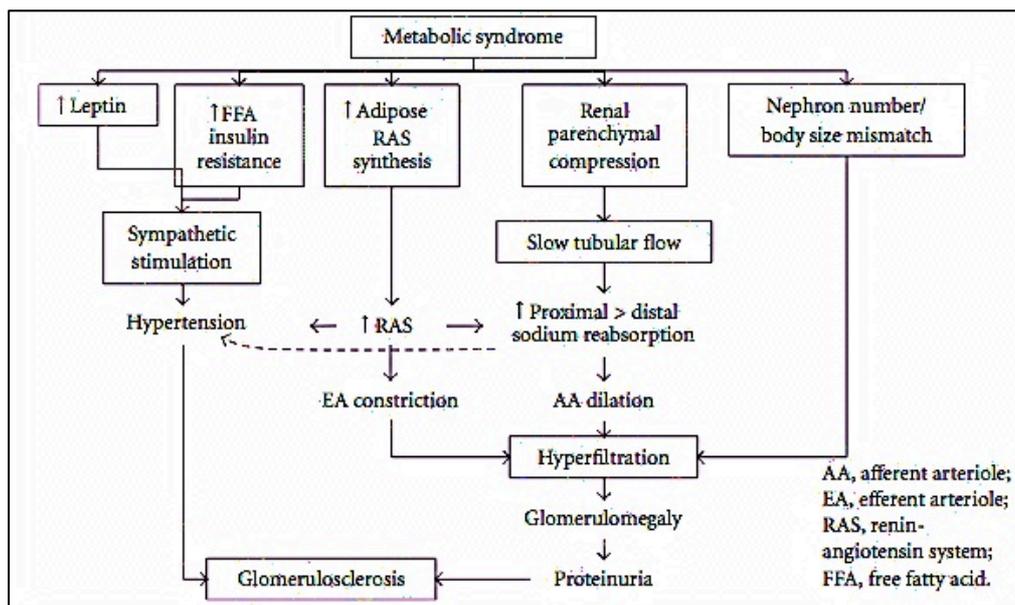
#### **4.4.4 Augmentation de la rétention de sodium au niveau tubulaire.**

La réabsorption de sodium à partir de l'urine primitive est augmentée dans l'obésité. Les mécanismes physiopathologiques à la base de la rétention sodée incluent les composants du système rénine-angiotensine (SRA), l'hyperinsulinémie et l'hyperactivité du système sympathique dans le rein (Hall, 2003 ; Zoccali, 2011). Ce phénomène peut être également lié à l'augmentation de la fraction de filtration (FF) associée à l'obésité, une FF élevée stimulant la réabsorption de sodium via l'augmentation de la pression oncotique glomérulaire (Laville, 2011). Notons de plus que le glucose est réabsorbé dans le tubule proximal de la même manière que le sodium. Présent en grande quantité, comme c'est le cas lors d'une hyperglycémie associée à l'obésité, le glucose est réabsorbé de manière accrue ce qui stimule en parallèle une forte réabsorption du sodium qui suit la pression oncotique engendrée par la réabsorption de glucose (Guyton & Hall, 2000). La rétention de sodium a pour conséquence l'arrivée d'une faible quantité de sodium au niveau de la macula densa, ce qui a pour effet de stimuler la synthèse de rénine et d'exacerber la vasodilatation de l'artériole afférente favorisant ainsi l'hyperfiltration glomérulaire (Zoccali, 2009).

#### **4.4.5 Activation du système rénine-angiotensine (SRA)**

Le SRA constitue un important mécanisme, qui, via le contrôle de la balance des électrolytes et des fluides, régule les fonctions surrénale, cardiovasculaire et rénale, incluant le processus de prolifération cellulaire, la vasomotricité et la structure du rein (Kalaitzidis & Siamopoulos, 2011). L'augmentation de la FF et de la rétention de sodium est une des résultantes de l'hyperactivité du SRA induite par l'obésité (Laville, 2011). Ce phénomène peut

être attribué à une sur-régulation des composants du SRA par le tissu adipeux, à une forte activité sympathique (via l'hyperleptinémie) ou à l'hyperinsulinémie (*Van Harmelen et al., 2000 ; Zoccali, 2009*). De plus, il a été montré que l'insuline avait un effet stimulant sur la synthèse d'angiotensinogène au niveau hépatique (*Ruan & Guan, 2009*). Cependant, cette hormone stimule également l'activité du récepteur à l'angiotensine II au niveau des cellules rénales en augmentant l'expression protéique et la production de l'ARN messager de la protéine (*Anderson et al., 1996*). Il a été démontré que le blocage de l'action de l'angiotensine dans un modèle transgénique d'obésité induisait une réduction des niveaux de TNF- $\alpha$  et du MCP-1, une augmentation de la production d'adiponectine et une atténuation du stress oxydatif, suggérant une interférence de l'angiotensine avec la régulation de la production des adipokines au niveau du tissu adipeux (*Zoccali, 2009*). Dans le cas de l'obésité, l'hyperactivation du SRA participe à la dégradation du système rénal via une exacerbation de l'hypertension et de la protéinurie, (*Nitta, 2011*). En provoquant la dilatation de l'artériole rénale efférente, accompagnée d'une vasoconstriction de l'artériole afférente, l'angiotensine II joue un rôle important dans l'hyperfiltration glomérulaire et participe donc à l'apparition de glomérulosclérose focale (*Ruster et al., 2013*). L'utilisation de bloqueurs du récepteur à l'angiotensine atténue les lésions glomérulaires, restaure les constantes hémodynamiques et diminue l'albuminurie dans des études expérimentales réalisées sur l'obésité et sur le diabète (*Bianco et al., 2005 ; Kato et al., 1999*).



**Figure 9** : Conséquences hémodynamiques de l'obésité entraînant les lésions rénales caractéristiques (D'après *Nitta, 2010*).

#### 4.4.6 Le stress oxydatif

Une production anormale d'ERO est observée chez les individus obèses. Cette surproduction représente un important acteur dans la progression des maladies rénales (*Ruan & Guan, 2009*). L'hyperglycémie est un facteur important dans l'apparition du stress oxydatif lié à l'obésité au niveau rénal, notamment via l'altération de la fonction mitochondriale et la stimulation de l'activité NADPH oxydase, une importante source d'oxydants (dans les cellules rénales telles que les cellules épithéliales tubulaires et les cellules mésangiales glomérulaires). Une glycémie élevée stimule ainsi la production de ERO par les cellules mésangiales (*Shah et al., 2007*). La génération de ERO contribue à la libération de TGF- $\beta$ , de MCP-1 et de

fibronectine via l'activation de voies transcriptionnelles incluant le NF $\kappa$ B dans les cellules mésangiales (*Shah et al., 2007*). Notons de plus qu'une augmentation de la production de superoxyde (O $_2^{\bullet}$ ) et de peroxyde d'hydrogène (H $_2$ O $_2$ ) a été démontrée dans des glomérules isolés à partir de rats diabétiques (*Koya et al., 2003*). L'importante production de molécules pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  déclenchée par l'excès de prise de poids peut induire des lésions rénales via la génération de ERO au niveau des cellules glomérulaires et des cellules du tubule proximal (*Ruan & Guan, 2009*). Le stress oxydatif provoque l'apoptose des cellules rénales parmi lesquelles les podocytes et les cellules mésangiales. Ces conditions sont connues pour accélérer la protéinurie, l'expansion mésangiale, la glomérulosclérose et la perte des fonctions rénales associée à l'obésité (*Shah et al., 2007*).

## 5. Le monoxyde d'azote

---

Parmi tous les facteurs impliqués dans les mécanismes physiopathologiques entraînant le dysfonctionnement rénal associé à l'obésité, nous nous sommes concentrés sur le rôle potentiel du monoxyde d'azote ou oxyde nitrique (NO) dans la progression des lésions glomérulaires et tubulaires. De nombreux articles ont mis en évidence un lien entre l'altération de la production du NO et l'IR observée dans la néphropathie diabétique, ce qui nous a poussé à nous intéresser à cette molécule.

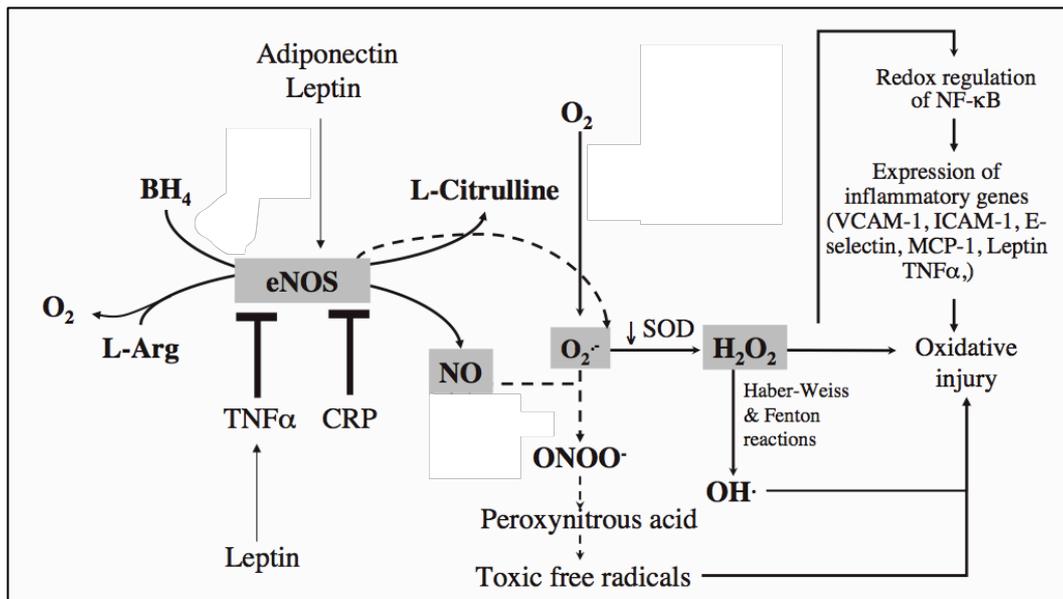
Le NO est un médiateur paracrine qui possède un grand nombre de cibles (enzymes et protéines). Cette molécule joue un rôle essentiel dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, comprenant le contrôle de la fonction immunitaire ainsi que de l'inflammation, et intervient dans la régulation de la transcription de plusieurs gènes, de l'apoptose et du tonus vasculaire (*Albrecht et al., 2002; Cheng et al., 2012; Förstermann & Sessa, 2012; Klahr, 2001*). Au niveau rénal, il participe à la régulation de l'excrétion du sodium et de l'eau, il contrôle la résistance vasculaire, module le DFG et assure l'intégrité rénale (*Avogaro & Vigili de Kreutzenberg, 2005*). Le NO est produit par trois isoformes différentes de la Nitric Oxyde Synthase (NOS) : la NOS endothéliale (eNOS), la NOS inductible (iNOS) et la NOS neuronale (nNOS) (*Förstermann & Sessa, 2012*). Ces enzymes utilisent la L-arginine comme substrat pour synthétiser la molécule de NO et sont exprimées par de nombreux types cellulaires répartis dans tout l'organisme. Dans le rein, la eNOS est fortement exprimée par les cellules de l'endothélium vasculaire (*Bachmann et al., 1995; Mount and Power, 2006*), tandis que la iNOS, principalement localisée dans les segments tubulaires distaux, peut également être exprimée par les cellules mésangiales, les cellules tubulaires proximales, les cellules musculaires lisses et les cellules inflammatoires. L'induction de la iNOS par les lipopolysaccharides fut démontrée dans la macula densa et dans l'endothélium vasculaire rénal (*Albrecht et al., 2002; Chou et al., 2001*). La nNOS, quant à elle, peut être retrouvée au niveau de la macula densa (*Albrecht et al., 2002*) et des cellules du tube collecteur (*Terada et al., 1992; Wang et al., 1998*). Le NO produit par la eNOS a comme principal effet d'induire une vasodilatation et une relaxation locale des vaisseaux sanguins. Il joue également un rôle essentiel, dans la perméabilité vasculaire et dans l'inflammation via une inhibition de l'agrégation et de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium (*Forstermann & Sessa, 2012*).

L'implication des NOS dans des conditions pathologiques telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète mellitus, l'hypercholestérolémie fut démontrée à plusieurs reprises. La iNOS a une action pro-inflammatoire et est exprimée par une variété de cellules inflammatoires, principalement les macrophages. Lorsque la quantité de NO produit par ces cellules devient trop élevée, comme après une forte production de TNF- $\alpha$ , le NO peut alors altérer l'intégrité des cellules saines et affecter la fonction des tissus environnants. Il a été

démontré que l'hyperactivation de la iNOS dans le rein suite à une transplantation est très néfaste pour le patient. L'expression de la nNOS dans le tissu rénal suggère qu'elle joue un rôle important. En effet, l'enzyme constituerait un facteur essentiel dans le feedback tubuloglomérulaire qui assure l'autorégulation du flux sanguin rénal et le taux de filtration glomérulaire (*Mount & Power, 2006; Singh & Thomson, 2010*).

Beaucoup de caractéristiques de l'insuffisance rénale chronique telles que l'albuminurie et l'hyperfiltration ont été associées à un dysfonctionnement endothélial. Par conséquent, l'implication d'une production anormale de NO fut proposée comme base des mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent le dysfonctionnement endothélial. Plusieurs études ont démontré un rôle de ce médiateur dans le développement de l'insuffisance rénale chronique associée à l'obésité ou le diabète. En effet, une diminution progressive de la production de NO est généralement observée parallèlement à la progression de la maladie rénale chez l'homme, mais aussi chez des rats et des souris diabétiques (*Baylis, 2008; Cheng et al., 2012; Erdely et al., 2004; Wever et al., 1999; Zhao et al., 2006*).

Les mécanismes physiopathologiques potentiellement responsables de la déficience en NO chez des sujets obèses sont multiples. Celle-ci peut être due à une diminution de la biodisponibilité en substrat, à un switch de l'utilisation du NO en faveur du stress oxydatif ou nitrosatif, à la diminution des niveaux plasmatiques en adiponectine, capable en temps normal de stimuler la phosphorylation de la eNOS au niveau des cellules endothéliales et donc de l'activer (*Baylis 2008; Xu et al., 2012*). Un stress oxydatif important faisant suite à une forte production d'ERO par différentes enzymes comprenant la NADPH oxydase, la xanthine oxydase ou les enzymes de la chaîne de respiration mitochondriale peut entraîner une déficience en NO (*Förstermann & Sessa, 2012*). En effet, ces ERO peuvent par la suite interagir avec le NO pour former du peroxy-nitrite et par conséquent, accentuer le stress oxydatif. Un autre phénomène, connu sous le nom de découplage de la eNOS, peut être à l'origine d'une diminution de la biodisponibilité en NO. En effet, lorsque l'enzyme est découplée, les anions superoxyde ( $O_2\bullet$ ) qu'elle produit peuvent réagir avec le NO pour produire du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), une molécule connue pour ses effets toxiques sur les tissus (*Huang, 2009*). L'hyperglycémie associée à l'obésité peut également contribuer à la génération d'oxydants et d'inhibiteurs endogènes du NO tels que le diméthylamine asymétrique, la protéine kinase C activée et le TGF- $\beta$ , lesquels occasionnent une diminution de l'activité du NO (*Zhao et al., 2006*). La production insuffisante de NO peut provenir d'une défaillance de l'eNOS. Des souris délétées pour le gène de la eNOS développent de l'hypertension provoquant des lésions rénales similaires à celles observées chez des souris wild-type diabétiques (*Nakagawa et al., 2007*). Une étude réalisée sur des souris diabétiques présentant des lésions rénales a révélé une altération de la phosphorylation et de la dimérisation de la eNOS ayant pour effet de diminuer la production de NO par l'enzyme. Le même phénomène fut observé sur des cellules endothéliales mises en culture, où l'activité de la eNOS avait fortement chuté en présence de glucose (*Cheng et al., 2012*). D'autres facteurs associés à l'obésité peuvent intervenir tels que l'insulino-résistance et l'inflammation chronique. En temps normal, l'insuline induit une vasodilatation via la libération de NO par la eNOS, mais lorsque la résistance à l'insuline se manifeste, ces vasodilatations dépendantes de l'action du NO sont atténuées. De plus, le TNF- $\alpha$  produit en large quantité dans la maladie métabolique, participe à la production de NO aux propriétés cardiotoxiques, puisqu'il stimule l'activité de la iNOS. Cette cytokine est également capable de diminuer la sensibilité des cellules endothéliales à exprimer la eNOS suivant une stimulation par l'insuline (*Paz et al., 2003; Aljada et al., 2002*).



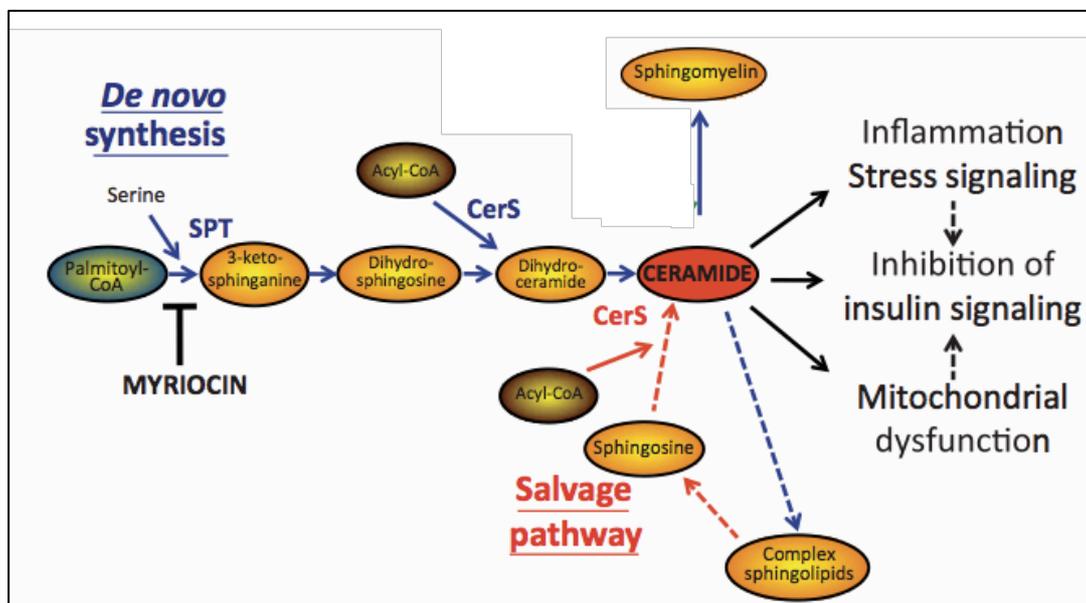
**Figure 10.** La Physiologie et la Physiopathologie de la eNOS (D'après *Avogaro & de Kreutzenberg, 2005*).

Au vu des ces observations, notre étude visait à mettre en évidence le rôle potentiel du NO dans le développement des maladies rénales associées à l'obésité. Pour ce faire, des souris C57Bl/6 âgées de 6 semaines ont été nourries soit avec un régime pauvre en graisse (Low-Fat Diet : LFD) ou soit avec un régime riche en graisse (High Fat Diet : HFD) sur une durée de 16 semaines. Le régime HFD est connu pour produire chez ces souris des altérations systémiques fortement similaires à celles observées chez des patients atteints de syndrome métabolique telles que l'obésité, l'hyperglycémie et des altérations du métabolisme des lipides (*Surwit, 1988; West, 1992*). Pour évaluer l'impact du NO sur le système rénal en condition de surpoids, des souris ont été traitées par administration orale avec un agent pharmacologique interférant de manière directe avec la biologie du NO : Le L-N6-(1-iminoéthyl)-lysine (L-NIL). Finalement, nous nous sommes également intéressés aux potentiels effets bénéfiques de la myriocine sur les aspects cliniques de l'obésité. Cet agent pharmacologique interfère avec le métabolisme des lipides et possède un effet indirect sur la eNOS. Les souris ont été placées aléatoirement dans différents groupes en fonction des traitements.

Le L-NIL est un inhibiteur spécifique de la iNOS. Le NO produit par la iNOS présente des propriétés pro-inflammatoires et pro-oxydantes. Plusieurs études ont souligné les effets néfastes d'une production excessive de NO par la iNOS sur le système vasculaire, contrairement à la eNOS, qui possède des effets bénéfiques (*Beckman & Koppenol, 1996*).

La myriocine est un produit naturel isolé à partir de *Isaria sinclairii* (*Fujita et al., 1994*) et un inhibiteur de la palmitoyltransférase. Cette enzyme est impliquée dans la synthèse *de novo* de céramide, catalysant la première étape de la synthèse du lipide consistant en la condensation de la sérine et du palmitoyl-CoA pour former du 3-Ketosphinganine (*Hanada et al., 1997*) (Figure 11). Le céramide constitue la molécule de base à la synthèse de tous les sphingolipides et jouerait un rôle essentiel dans la régulation du poids corporel et de l'énergie issue du métabolisme (*Yang et al., 2008*). L'excès de poids occasionne une altération du métabolisme et de la synthèse des sphingolipides. En effet, beaucoup de conditions associées à l'obésité favorisent la synthèse du céramide tels que des stimuli pro-inflammatoires, un stress oxydatif élevé et des niveaux élevés en acides gras (*Hannun & Obeib, 2002; Yang et al., 2009; Zheng et al., 1994*) Un traitement à base de myriocine entraîne une diminution des niveaux circulants de céramide chez des souris rendues obèses par une régime très riche en graisse ou rendues obèses génétiquement (*ob/ob*). Cette diminution est accompagnée d'une

réduction du poids ainsi que d'une amélioration de la consommation d'énergie et du métabolisme. Dans cette même étude, la sensibilité du foie et des muscles à l'insuline est également améliorée corrigeant ainsi le métabolisme du glucose (Yang *et al.*, 2008). Le même résultat fut observé chez des rats Zucker diabétiques dont la tolérance au glucose fut améliorée après administration de myriocine, ce qui suggère une implication du céramide dans la résistance à l'insuline liée au syndrome métabolique (Frangioudakis *et al.*, 2010 ; Schmitz-Peiffer, 2010 ; Yang *et al.*, 2008). Cette diminution de la production de céramide via l'utilisation de myriocine a le bénéfice de ne pas engendrer des intermédiaires de la voie de synthèse (Merril, 2002). Une altération de la vasodilatation de l'endothélium induite par le céramide fut démontrée, ce qui implique le rôle potentiel de ce lipide dans le dysfonctionnement endothélial associé à l'obésité, notamment via un effet indirect du céramide sur l'activité de la eNOS. En inhibant l'association de la protéine phosphatase 2 (PP2A) avec son inhibiteur, le céramide favorise l'interaction de la PP2A avec la eNOS. Une fois associés, la PP2A désphosphoryle la eNOS ce qui a pour effet de diminuer l'activité de cette dernière. La PP2A agit en atténuant la phosphorylation du pool d'AKT colocalisée avec la eNOS (Zhang *et al.* 2012). Au vu de ces observations, l'implication du céramide dans la diminution de la production de NO semble être une cause au dysfonctionnement endothélial associé à l'obésité.



**Figure 11** : Schéma de la voie de synthèse *de novo* et sauvage du céramide. La SPT catalyse la première étape de la synthèse consistant en la condensation de la sérine avec le palmitoyl-CoA. La myriocine inhibe cette première enzyme. Une production excessive de céramide peut entraîner divers perturbations comprenant une augmentation de l'inflammation, une diminution de la sensibilité à l'insuline et un dysfonctionnement mitochondrial (CerS = Céramide Synthase ; SPT=sérine palmitoyltransférase) (Modifié d'après Schmitz-Peiffer, 2010).

## 6. Objectifs du mémoire.

Avec l'importante augmentation de la prévalence de l'obésité, les cas d'insuffisances rénales sont de plus en plus fréquents et il est essentiel de connaître les mécanismes par lesquels le syndrome métabolique peut mener à la maladie rénale et ce, dans le but de développer des traitements adaptés. Ce mémoire a pour premier but de caractériser l'obésité dans le modèle murin C57Bl/6. La souche de souris C57Bl/6 est très utilisée en expérimentation animale. Elle semble être le modèle animal le mieux adapté pour étudier l'obésité car de nombreuses sources bibliographiques affirment que cette souche remplit le plus

grand nombre de critères relatifs aux caractéristiques humaines recherchées. De plus, elle permet une bonne reproductibilité des expériences. Ce modèle nous permet d'étudier l'impact de l'obésité comme cause primaire de l'insuffisance rénale puisque les souris n'ont pas subi de modifications génétiques les rendant obèses mais suivent uniquement un régime basé sur une alimentation riche en graisses. La deuxième partie consiste en l'étude des mécanismes qui mènent de l'obésité à l'insuffisance rénale. Les altérations rénales d'ordre fonctionnelles et structurelles en réponse à l'obésité induites par une nourriture riche en graisse ont été évaluées en utilisant des critères tels que les lésions rénales, les marqueurs de l'inflammation et le stress oxydatif. Parmi toutes les cibles étant potentiellement impliquées dans la progression de la pathologie, nous nous sommes concentrés de manière plus spécifique sur le NO. Pour atteindre cet objectif, une partie de notre étude a été consacrée aux effets résultant de l'administration de molécules pharmacologiques tels que le L-NIL modulant la biodisponibilité du NO. Enfin, nous avons évalué les effets bénéfiques potentiels d'un traitement basé sur l'injection de myricicine sur les principaux marqueurs de l'obésité.

## 1. Groupes expérimentaux

---

La procédure expérimentale fut réalisée sur 64 souris mâles C57Bl/6 wild-type âgées de 6 semaines (Harlan Laboratory – UK). Toutes les procédures effectuées sur les animaux ont été approuvées par le comité éthique local. Les souris furent hébergées dans un local dont la température est maintenue constante à 21°C et où l'humidité est contrôlée régulièrement. L'éclairage de l'hébergement suit un cycle jour/nuit de 12h/12h. Dans le but d'étudier l'impact d'un régime alimentaire riche en acide gras sur la physiologie de l'animal, les souris ont été divisées en 3 groupes expérimentaux basés sur 3 régimes alimentaires différents :

- Un régime standard (STD): le régime est constitué de 5,1 % de graisses et de 21,4 % de protéines (2,83 Kcal/grammes) (SAFE A03, France).
- Un régime contrôle pauvre en graisses (LFD - Low Fat Diet – D12450J) : le régime LFD est constitué, en termes de calories, de 10 % de graisse, de 20 % de protéines et de 70 % d'hydrates de carbone (5,24 Kcal/grammes). La nourriture nous a été fournie par la société Research Diets (New brunswick, NJ, USA).
- Un régime riche en graisse (HFD - High Fat Diet – D12492) : le régime HFD est constitué, en termes de calories, de 60 % de graisses, de 20 % de protéines et de 20 % d'hydrates de carbone (3,84 Kcal/grammes). La nourriture nous a été fournie par la société Research Diets (New brunswick, NJ, USA).

La procédure expérimentale s'étend sur une durée de 16 semaines. Dès la première semaine de protocole, les souris sont subdivisées en 7 groupes expérimentaux. Parmi ces groupes, certains ont reçu un traitement pharmacologique. Le premier traitement consiste en l'administration orale de L-NIL (BACHEM, Suisse), un inhibiteur spécifique de la iNOS. Le L-NIL a été dissous dans l'eau de boisson avec une concentration finale de 0,1 %. Le deuxième traitement consiste en l'injection de myriocine (Sigma, USA) par voie intrapéritonéale à une dose de 0,5 mg/Kg et ce, tous les 2 jours. La solution de myriocine est préparée à partir de 2 mg de myriocine ajoutée à 2 ml de méthanol (VWR international, France). Dix-huit ml d'eau saline (NaCl, 0,9%) sont ensuite ajoutés à cette solution. Avant chaque injection, la solution est vortexée. La myriocine est un inhibiteur spécifique de la palmytoyltransférase, une enzyme impliquée dans la synthèse *de novo* du céramide.

Les 7 groupes expérimentaux sont les suivants :

- STD sans traitement (n=10)
- LFD sans traitement (n=12)
- LFD avec traitement par administration orale de L-NIL (n=6)
- LFD avec traitement par injection intrapéritonéale de Myriocine (n=6)
- HFD sans traitement (n=13 souris)
- HFD avec traitement par administration orale de L-NIL (n=8)
- HFD avec traitement par injection intrapéritonéale de Myriocine (n=9)

## 2. Fonctions rénales et capacités excrétoires

---

Afin de mieux caractériser la fonction rénale, les animaux ont été placés en cages métaboliques aux semaines 0, 1, 4, 8, et 16 (Figure 12). La mise en cages métaboliques se déroule en deux phases, une période d'acclimatation de 48 heures et une période de récolte des

urines de 2 x 24 heures. Ces cages sont constituées de manière à séparer dans deux compartiments différents les excréments et l'urine. Le volume urinaire excrété ainsi que la quantité de nourriture et d'eau ingérée par les souris peuvent être déterminés en mesurant le poids des racks contenant la nourriture, et les biberons avant et après les 48 heures de mise en cage métabolique. Afin de garantir une récolte optimale des échantillons, les compartiments récoltant les urines contiennent chacun 1 ml d'huile permettant d'éviter une évaporation potentielle de l'urine sur 24 heures. Le dispositif est nettoyé après chaque période de mise en cage.

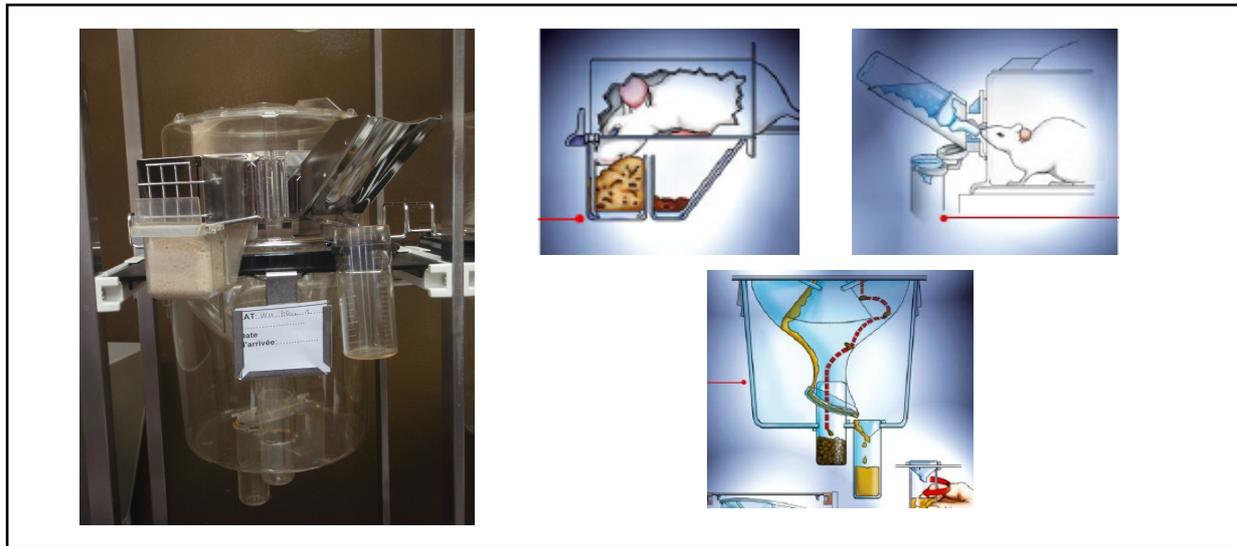


Figure 12. Agencement des cages métaboliques

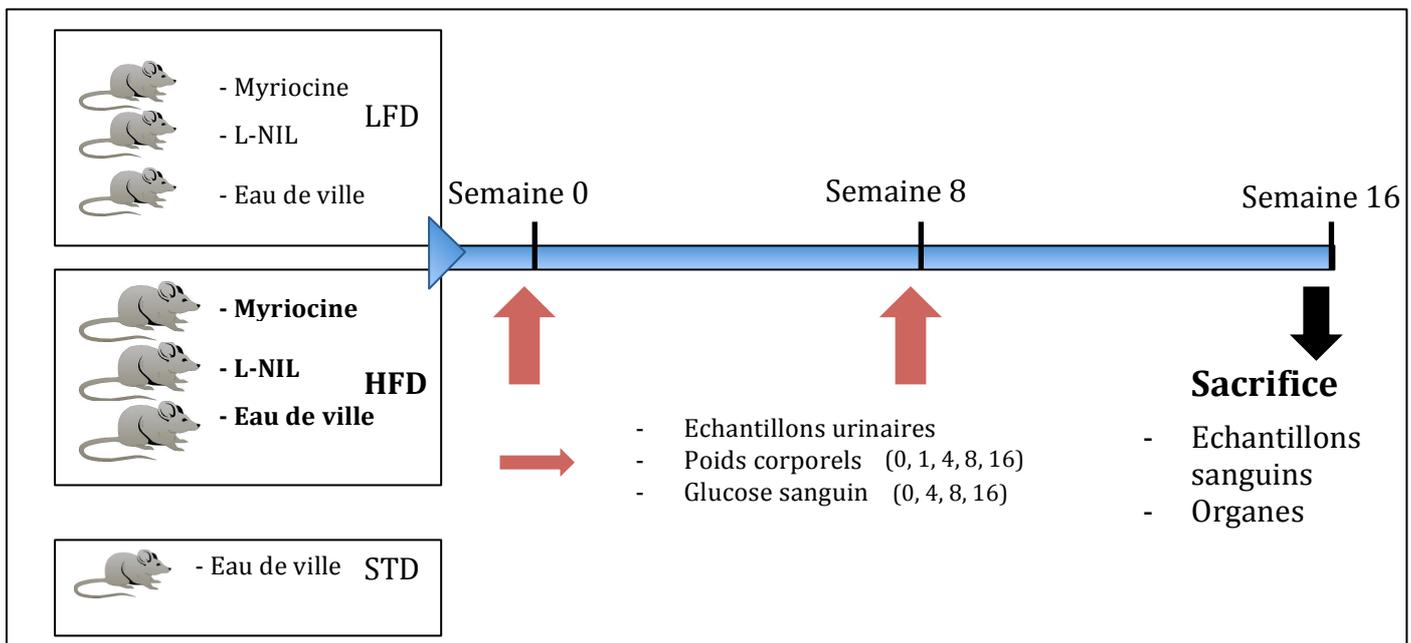


Figure 13. Schéma du protocole expérimental illustrant les différents groupes expérimentaux distribués en fonction du régime alimentaire et du traitement pharmacologique (HFD : High-Fat Diet ; LFD : Low Fat Diet ; STD : régime standard). Aux semaines 0, 1, 4, 8 et 16, la glycémie et le poids des souris ont été mesurés et de l'urine de chaque souris a été collectée. A la semaine 16, les souris ont été euthanasiées permettant de récupérer le sang et les organes d'intérêts.

Pour chacun des points temporels décrits, à savoir, à la semaine 0, 1, 4, 8 et 16, la glycémie et le poids corporel de chaque souris furent mesurés après 6 heures de mise à jeun. La glycémie est mesurée grâce au système d'autosurveillance de la glycémie OneTouch® Vita™ qui consiste en un capillaire sur lequel une goutte de sang est placée. La goutte de sang est prélevée à partir de la veine caudale après avoir placé l'animal dans un tube de contention. La bande réactive est introduite dans le lecteur OneTouch® Vita™ (Lifescan Benelux, Belgique) dont l'écran indiquera la glycémie en mg/dl.

Une fois collectés, les échantillons d'urines ont été centrifugés (2500 tours par minutes) pendant 10 minutes à 4°C afin d'éliminer l'huile contenue dans les tubes de récolte. Les échantillons ont ensuite été aliquotés (100 µl par eppendorf - maximum 10 eppendorfs par animal). Les aliquots ont été conservés à -80°C pour des analyses ultérieures.

### 3. Échantillons biologiques

---

À la fin des 16 semaines de protocole, les souris ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale de kétamine (80 mg/Kg, CEVA, Belgique) et de xylazine (20 mg/Kg, BAYER, Belgique). Les souris ont été euthanasiées par ponction intracardiaque, ce qui nous a permis d'obtenir un volume maximal d'échantillon sanguin. Les souris sont ensuite disloquées, afin de pratiquer la double euthanasie. Le sang prélevé sur glace dans des tubes héparinés est centrifugé à 1600 g pendant 10 minutes à 4°C. Le plasma, séparé des éléments figurés du sang, est ensuite récolté et stocké à -80°C jusqu'à son utilisation ultérieure. Le foie, le cœur, le tissu adipeux blanc (graisse viscérale et rénale) et les deux reins ont été collectés et pesés pour chaque souris. Le tibia droit a également été prélevé et mesuré afin de normaliser les valeurs de poids des organes prélevés. Après avoir été décapsulés et pesés, les reins ont été coupés en 4 parties. Une partie fut fixée par immersion du tissu dans du Bouin alcool (22 % d'eau distillée; 26 % de formol, 7 % d'acide acétique et 45 % d'une solution d'acide picrique : 6,75 g dans 450 ml d'éthanol absolu) (liquide de Bubosq-Brazil), un autre morceau dans du PAF 4% (Paraformaldéhyde ; Sigma, USA), afin de procéder ultérieurement à des analyses immunohistochimiques et histologiques. Les autres pièces tissulaires ont été congelées dans de l'azote liquide et conservées dans des eppendorfs à -80°C.

### 4. Approches analytiques

---

#### 4.1 Évaluation de la fonction rénale.

---

Dans le but de déterminer l'atteinte de la fonction rénale, les échantillons urinaires ont été analysés afin de mesurer la concentration en créatinine. Le dosage de la créatinurie fut réalisé par analyse HPLC (high performance liquid chromatography) (Waters 1525, Binary HPLC Pump) en collaboration avec le laboratoire de recherche de néphrologie expérimentale du Dr. J. Nortier de l'Université de Bruxelles – (ULB - Bruxelles). Le dosage de la concentration urinaire en créatinine nous permet de normaliser les valeurs de concentration urinaire d'autres molécules telle que l'albuminurie, étant donné l'importance des variations des taux de flux urinaire entre les animaux. Elle permet, entre autre, d'évaluer le DFG et on sait qu'une altération des niveaux urinaires en créatinine traduit généralement une diminution du flux sanguin rénal associée par exemple au diabète ou aux maladies cardiovasculaires.

La concentration urinaire en albumine a été évaluée via un kit ELISA (Albuwell M - Exocell, Philadelphia, USA). Le dosage de l'albumine est basé sur le principe de compétition. Une plaque pré-coatée avec de l'albumine est utilisée. L'échantillon placé dans les puits

contient également de l'albumine sous forme libre. Un anticorps dirigé contre l'albumine est ajouté dans tous les puits et peut aller reconnaître soit l'albumine fixée, soit l'albumine libre contenue dans l'échantillon. Plus il y a de l'albumine présente dans l'échantillon, moins l'anticorps pourra se lier à l'albumine fixée au puits. Les composants présents dans la phase liquide sont ensuite lavés. Plus il y a d'albumine dans l'échantillon plus il y aura de complexes Albumine libre-anticorps et moins il y a d'anticorps liés à l'albumine fixée au fond du puits. Un système de détection est couplé à l'anticorps permettant de le mettre en évidence. La quantité d'albumine contenue dans l'échantillon est inversement proportionnelle au signal colorimétrique. Les absorbances des différents échantillons ont été mesurées grâce à un spectrophotomètre (Molecular devices – versa max Microplate reader – US). Les concentrations en albumine sont calculées à l'aide d'une courbe standard de quantités connues d'albumine. Les valeurs sont ensuite exprimées par  $\mu\text{g}$  albumine/mg de créatinine.

## **4.2 Dosage de la créatinémie**

---

La concentration de créatinine plasmatique fut déterminée par analyse HPLC (high performance liquid chromatography) (Waters 1525, Binary HPLC Pump) en collaboration avec le laboratoire de recherche de néphrologie expérimental du Dr. J. Nortier de l'ULB – (ULB - Bruxelles). Cette mesure est un indice de la fonction rénale et du DFG.

## **4.3 Stress oxydatif**

---

Comme indice de stress oxydatif, les échantillons urinaires collectés à la semaine 16 ont été analysés pour déterminer la concentration en peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) via l'Amplex® red Assay (Amplex red hydrogen/peroxidase assay kit – Eugen, Oregon, USA). Le test colorimétrique est basé sur une réaction entre le réactif Amplex Red et le  $\text{H}_2\text{O}_2$  présent dans les échantillons biologiques, ce qui induit la formation d'un produit d'oxydation rouge fluorescent. La lecture fut réalisée à l'aide d'un fluoroscanner (Fluoroscanner Ascent - Thermo electron corporation ; longueur d'onde d'émission : 590 nm ; longueur d'onde d'absorbance : 560 nm). La concentration en hydrogène peroxide des échantillons est calculée grâce à la courbe d'échantillons standards et est exprimée en nmol/mg de créatinine.

## **4.4 Dosage plasmatique des acides gras non-estérifiés (NEFA)**

---

La mesure de la concentration plasmatique en NEFA fut réalisée grâce à l'utilisation du Kit Wako NEFA-HR (Wako pure Chemical Industries, Ltd, Japon). Le principe du kit repose sur la méthode ACS-ACOD-MEHA (Acyl-CoA-Synthetase, Acyl-CoA-Oxidase, 3-Methyl-N-Ethyl-N-( $\beta$ -hydroxyethyl)aniline). En présence d'adénosine 5-triphosphate et de coenzyme A, les NEFA présents dans le sérum sont convertis en Acyl-CoA et en AMP par l'enzyme Acyl-CoA synthétase. L'oxydation de l'Acyl-Coa par l'Acyl-CoA oxydase induit la libération de 2,3-trans-Enoyl-CoA ainsi que de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Lorsqu'il est mis en présence de peroxydase, ce dernier produit un pigment bleu-violet, dont l'absorbance est mesurable au spectrophotomètre. La densité optique fut déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre à 550 nm (Molecular devices – Versa max Microplate reader – US). L'absorbance du pigment est proportionnelle à la quantité de NEFA présente initialement dans le sérum. La concentration en NEFA des échantillons est calculée grâce à la courbe d'échantillons standards et est exprimée en nM.

#### **4.5 Dosage plasmatique de l'adiponectine**

---

Le dosage quantitatif de l'adiponectine dans le sérum fut réalisé via la méthode ELISA sandwich. La méthode est basée sur l'utilisation d'une plaque ELISA/multipuits dont les puits sont coâtés avec des anticorps anti-adiponectine polyclonaux anti-souris. Les échantillons sont placés dans les puits, et l'adiponectine va venir se lier aux anticorps présents au fond du puits. Un deuxième anticorps biotynilé anti-souris est ajouté à l'échantillon et va venir se lier aux molécules précédemment captées. Le matériel qui ne s'est pas lié est ensuite lavé. On conjugue ensuite une HRP aux anticorps immobilisés et le contenu du puits est une fois encore lavé. La quantité d'anticorps immobilisés et conjugués avec la HRP est alors quantifiée en présence du réactif 3, 3', 5, 5' tetramethylbenzidine qui interagit avec la molécule HRP. La densité optique fut déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm (Molecular devices – Versa max Microplate reader – USA). L'absorbance du pigment est proportionnelle à la quantité d'adiponectine présente initialement dans le sérum. La concentration en adiponectine des échantillons est calculée grâce à la courbe d'échantillons standards et est exprimée en µg/ml.

#### **4.6 Dosage des Nitrites/Nitrates (NOx)**

---

La concentration urinaire en NOx a été déterminée via l'utilisation du kit ELISA (Cayman Chemical Company- An Harbor, USA). La réaction colorimétrique est basée sur l'utilisation du réactif de Griess. Avant ca, les nitrates présents dans les échantillons urinaires doivent être convertis en nitrite via l'action de la nitrate reductase. Après cela, le réactif de Griess est rajouté à l'échantillon et va venir convertir tous les nitrites en un composé bleu-violet dont l'absorbance peut être mesurée après 10 minutes d'incubation. La lecture de plaque multipuits contenant les échantillons urinaires a été réalisée par l'utilisation d'un spectrophotomètre à 540 nm (Molecular devices - Versa max microplate reader – USA). Les valeurs sont exprimées en µmol/mg de créatinine.

### **5. Analyses morphologiques**

---

Comme décrit précédemment, une fois que les reins ont été récoltés, un quart de chaque tissu fut immergé dans du Bouin alcool durant une période de 48 h ; un autre quart dans du PAF 4% pour une durée de 24 h. Une fois fixés, les tissus sont déshydratés grâce à une succession de bains d'alcools :

- 3 bains d'éthanol absolu successifs répartis sur une journée suivie d'un bain « overnight »
- 3 bains de butanol successifs répartis également sur 24 heures.

Une fois déshydratés, les échantillons tissulaires sont plongés dans de la paraffine liquide à 60°C. Trois bains de paraffine sont effectués à raison de 1 bain par jour sur une durée de 3 jours. À la fin de cette étape, les tissus sont finalement enrobés dans des blocs de paraffine fraîche permettant de réaliser ultérieurement des coupes histologiques. Ces coupes ont une épaisseur de 5 µm et sont réalisées à l'aide d'un microtome Autocut 2040 (Richert Inc., USA) équipé de lames en acier. Les lames porte-objet sur lequel les coupes seront placées sont traitées au silane (3-aminopropyltriéthoxylane, 98 %, Sigma, USA) afin d'assurer une adhésion efficace du tissu sur le verre. Les coupes de tissus sont alors déposées sur un fin film d'eau à la surface des lames porte-objet. Enfin, les lames sont placées sur une plaque chauffante (35 °C)

pendant 5-6 heures ; les lames sont alors prêtes à être utilisées pour des colorations histologiques ou immunohistochimiques ultérieures.

## **5.1 Coloration au PAS (Periodic Acid Schiff), à l'Hémalun et au Bleu de Luxol**

---

La coloration PAS 1% (Parasiline, Sigma, USA) permet de mettre en évidence les sucres ou polysaccharides en rose ce qui favorise une visualisation optimale des différentes structures du rein et notamment des lésions.

Avant d'être colorées, les coupes sont préalablement déparaffinées puis réhydratées. Pour ce faire, les lames sont plongées dans 2 bains successifs de toluène durant une période de 5 minutes, puis sont rincées dans trois bains d'éthanol 95 ° avant d'être placées dans de l'eau courante pendant 10 minutes pour être réhydratées.

Après cette étape, les lames sont traitées selon le protocole suivant :

- 8 minutes dans de l'acide périodique 1 %
- 3 minutes dans du PAS
- 5 minutes dans de l'eau courante
- 45 secondes dans l'hémalun de Mayer (Hematoxyline Mayer, J.T.Baker, Pays-Bas)
- 5 minutes dans de l'eau courante
- Un passage dans un bain d'éthanol absolu
- 1 minute dans le Bleu de Luxol (Alfa Aesar® 0,1 % dans l'alcool 95°)

Une déshydratation des lames est finalement effectuée. Les lames sont lavées par 3 passages successifs dans de l'alcool à 95 ° puis un passage dans du butanol et finalement 2 bains de toluène. Les coupes sont finalement montées grâce au dépôt d'une fine lamelle couvre-objet sur la lame et peuvent être observées au microscope.

## **5.2 Immunohistochimie**

---

### **5.2.1 Pré-traitements**

La mise en évidence de l'antigène d'intérêt est permise grâce à une protéine biotinylée, qui va venir se lier spécifiquement à la molécule exprimée dans le tissu rénal. Les lames ont premièrement été déparaffinées et réhydratées (de manière identique au protocole décrit pour la coloration PAS). Afin de démasquer les antigènes présents dans le tissu, les lames ont subi un démasquage au tampon citrate 0,01 M à pH 6.2 (21 g d'acide citrique dans 1 L de solution) (Sigma-Aldrich, USA) selon la procédure suivante :

- 3 minutes sur 800 Watts au micro-onde
- 10 minutes sur Defrost au micro-onde
- Refroidissement à température ambiante pendant approximativement 20 minutes

Les lames sont ensuite plongées dans un bain de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,06 %) durant 5 minutes de manière à éliminer l'activité de peroxydases endogènes potentiellement présentes dans le tissu. Cette étape permet d'éviter une éventuelle réaction entre les peroxydases et le réactif utilisé pour la révélation des antigènes à la fin du protocole. Les lames sont rincées dans de l'eau distillée puis dans du tampon PBS pH 7,4 (0,04 mol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>12H<sub>2</sub>O; 0,01 mol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 0,12 mol/l NaCl).

Les lames sont incubées durant 15 minutes avec une solution d'avidine (Vector Laboratories, Inc., USA) et sont ensuite rincées dans du tampon PBS. Cette étape a pour but d'inhiber la biotine endogène du tissu. Après traitement à l'avidine, celle-ci doit être inhibée par incubation des lames avec une solution de biotine durant 15 minutes (Vector Laboratories Inc., USA). Cette étape permet de saturer tous les sites actifs non occupés de l'avidine. Les lames sont ensuite rincées dans du tampon PBS.

Les lames sont finalement traitées par une solution de caséine (0,5 % dans du PBS) durant 30 minutes, permettant ainsi de bloquer les sites de fixation aspécifiques des protéines.

### **5.2.2 Immunohistochimie**

Les coupes sont incubées avec l'anticorps primaire et sont placées en chambre humide overnight pour éviter une déshydratation du tissu.

Les anticorps primaires utilisés dans ce travail sont : NEP (CD10 Z-145, Rat monoclonal IgG2b, Santa Cruz Biotechnology), AQP1 (Anti-Aquaporine-1 AB 2219, Rabbit polyclonal, Temecula Californica), eNOS (Anticorps anti-eNOS, Rabbit Pab RB-9279-P, NeomarkerS Fremont, CA) et iNOS, (Anticorps anti-iNOS, Rabbit Pab RB-9242-P1, Neomarkers Fremont, CA). Le lendemain, les lames sont rincées dans du tampon PBS puis exposées à l'anticorps secondaire durant 1 heure, puis rincées dans du PBS. Les anticorps secondaire consistent en un anti-rabbit pour la iNOS, la eNOS et l'AQP1 et d'un anti-rat pour la NEP. Dans le but d'amplifier le signal, les coupes sont ensuite traitées avec de la streptavidine peroxidase. Les lames sont finalement rincées dans du tampon PBS avant d'être révélées.

La révélation de l'antigène est réalisée à l'aide d'une solution de DAB 0,05 % (3' Diaminobenzidine, Sigma, USA) dans du PBS contenant 0,02 % d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Lorsque le DAB s'oxyde suite à la réaction des peroxydases avec l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, il précipite sous forme d'un composé brun-noir visible au microscope. Lorsque le contraste est optimal, les lames sont plongées dans de l'eau distillée pour arrêter la réaction.

Les lames sont ensuite colorées à l'aide de l'hémalum et du Bleu de luxol et montées de la même manière que pour la coloration PAS décrite précédemment.

## **6. Analyses des atteintes glomérulaires et structurales**

---

Une analyse quantitative des différents éléments propres aux glomérules ainsi que leur surface a été réalisée sur des coupes en paraffine colorées avec du PAS. Pour chaque animal, pour lequel une coupe histologique de rein a été obtenue, vingt glomérules ont été choisis au hasard dans le cortex rénal et ont été évalués à l'aveugle. L'image de chaque glomérule a été recouverte avec une grille (2500 pixels<sup>2</sup>). Chaque intersection de la grille a été identifiée en fonction des éléments sur laquelle est reposait : la lumière des capillaires, la matrice mésangiale (positive pour le PAS) et pour le nombre de noyaux. La surface glomérulaire fut calculée en comptabilisant l'entièreté des intersections reposant sur la surface glomérulaire. La valeur obtenue pour la surface glomérulaire est égale aux valeurs obtenues pour les noyaux, la matrice mésangiale et la surface glomérulaires additionnées.

La fréquence des tubules contenant des vacuoles (nombre de tubules contenant des vacuoles/mm<sub>2</sub>) au sein des cellules a été évaluée sur une base semi-quantitative. Afin d'uniformiser la procédure d'évaluation, une lentille supplémentaire gravé avec un quadrillage a été insérée dans l'un des oculaires du microscope. Pour chacune des sections de tissu rénal, 20 champs quadrillés ont été observés à un grossissement 400x.

## 7. PCR quantitative en temps réel

---

Afin d'évaluer les niveaux de transcription du gène codant pour la iNOS et pour la eNOS au sein du tissu rénal, nous avons effectué une PCR quantitative en temps réel. Cette technique vise à mettre en évidence l'amplification d'une séquence d'ADN (ici celle codant pour la iNOS et pour la eNOS) en temps réel via l'utilisation d'une molécule fluorescente (Syber Green). Trois étapes sont alors nécessaires pour quantifier l'expression de l'ARNm en iNOS et en eNOS.

### 7.1 Extraction de l'ARN

---

L'entièreté des ARNm présents dans les différents échantillons de tissus ont été extraits par la méthode au Trizol. Pour ce faire, les échantillons tissulaires ont été homogénéisés en présence de trizol et traités successivement avec du chloroforme, de l'isopropyl alcool, et de l'éthanol. Après avoir subi plusieurs étapes de centrifugation entre chaque traitement, les échantillons finaux obtenus (contenant l'ARN total) ont été traités à l'ADNase afin d'éliminer toute trace d'ADN génomique contaminant, présent dans les échantillons.

Le dosage de la concentration des échantillons en ARN total a été réalisé à l'aide de l'utilisation du Nanodrop 1000 (NanoDrop 1000, spectrophotometer Thermo Scientific – USA).

### 7.2 Transcription inverse (RT : Reverse transcription)

---

Cette étape consiste à convertir l'entièreté des ARN obtenus dans la première étape en ADN complémentaire (ADNc).

En fonction de la concentration en ARN/échantillon révélée par le nanodrop, nous avons calculé la quantité d'échantillons à prélever de manière à obtenir l'équivalent de 2 µg d'ARN/échantillon. Avant d'ajouter les mix RT, les tubes ont été chauffés durant 8 minutes à 65°C puis refroidis à 4°C. Le mix PCR + RT contient 6 µl d'ARN, 7 µl d'eau ARNase free, 1 µl de dNTP, 4 µl de tampon MLV (Murine leukemia virus), 1 µl de MLV et 1 µl de tampon hexamer 1/10. 14 µl de mix est ensuite ajouté à chaque tube. Les tubes sont vortexés puis centrifugés avant d'être incubés dans la machine PCR durant 10 min à 25°C, puis 50 minutes à 42°C et finalement 15 minutes à 70°C (Bio-Rad, T100™ Thermo Cycle – Belgique). Après cette étape, les échantillons sont aliquotés. 10 µl sont prélevés et serviront de solution stock tandis que 90 µl d'eau ARNase free sont ajoutés aux 10 µl d'échantillon restant. Une fois vortexés et centrifugés, les échantillons sont prêts à être utilisés dans la prochaine étape.

### 7.3 qPCR (Real-Time PCR)

---

La séquence d'ADNc codant pour les deux NOS fut amplifiée par PCR (polymerase chain reaction) à l'aide de primers se plaçant de façon complémentaire de part et d'autre de la séquence d'intérêt. Avant cette étape, le mix PCR doit être préparé et déposé sur la plaque à laquelle 5 µl d'ADNc seront ajoutés ultérieurement dans chaque puits. Le mix PCR contient les primers antisens (Reverse), les primers sens (Forward), et le mix Sybergreen, un agent intercalant fluorescent qui va permettre de mettre en évidence l'amplification du gène d'intérêt. Une fois l'ADNc mis en présence avec le mix PCR, la plaque est centrifugée à 1200 rpm durant 3 minutes. L'étape ultérieure d'amplification est réalisée après avoir placé la plaque dans la

machine Real-Time PCR (7300 RT-PCR System, Applied BioSystems). Notons ici que le gène d'ARN ribosomal 18 S a été choisi comme « housekeeping gene ».

## **8. Analyses statistiques**

---

Les données présentées sont des moyennes  $\pm$  SEM. La limite de signification a été définie à  $P < 0,05$ .

- Un test de variance one-way ANOVA a été effectué pour comparer les moyennes entre plus de deux groupes expérimentaux différents.
- Un test de variance two-way ANOVA a été réalisé pour comparer les moyennes entre plus de deux groupes expérimentaux à différents timings.
- Un post-test paramétrique de Newman Keuls a été réalisé afin d'identifier les différences significatives entre les différents groupes et en comparaison aux valeurs contrôles.

## **Partie 1. Caractérisation d'un modèle d'insuffisance rénale induite par un régime riche en graisses chez la souris C57Bl/6**

---

Comme nous l'avons décrit dans la partie méthodologique, nous allons dans ce travail nous focaliser sur trois types de régimes alimentaires pour lesquels les abréviations STD pour nourriture standard, LFD correspondant à un régime faible en acide gras et enfin les HFD, correspondant à un régime riche en acide gras, seront utilisées. Différents traitements pharmacologiques ont également été inclus et seront décrits dans les parties 2 et 3 des résultats. Par conséquent, l'objectif de cette section (résultats partie 1) est de valider notre modèle expérimental. Pour ce faire, seuls les groupes STD, LFD et HFD seront comparés.

### **1.1 Variation de l'augmentation relative du poids corporel (%)**

---

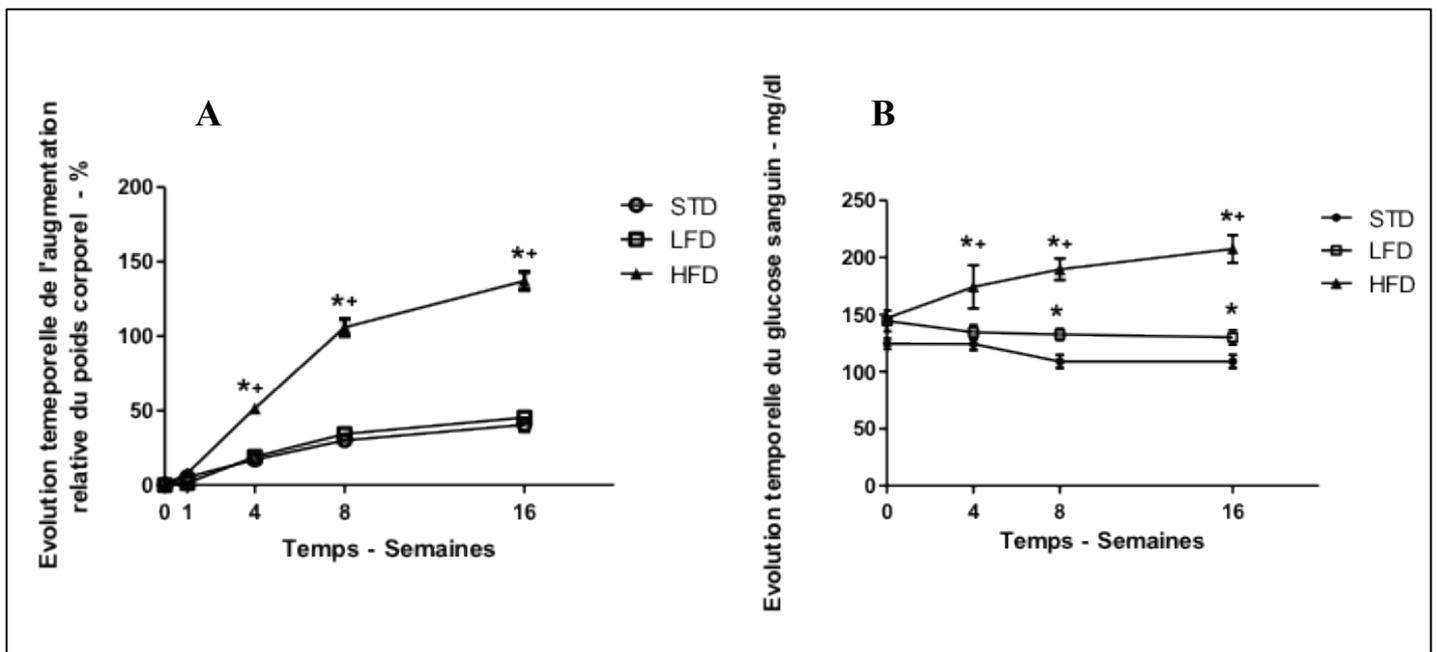
Afin d'évaluer l'impact de l'obésité sur la physiologie rénale, il est important de déterminer si les souris soumises à un régime riche en graisse développent une surcharge pondérale. Par conséquent, le poids corporel des souris fut évalué individuellement à différents timings au cours du protocole expérimental, plus précisément, aux semaines 0, 1, 4, 8 et 16. L'évolution relative du poids corporel des souris est représentée à la figure 14A. Cette évolution est donnée par le pourcentage de la variation pondérale en référence au poids corporel initial des souris mesuré à la semaine 0 du protocole. Les valeurs ont été obtenues d'après la formule  $x = ((\text{SemaineX} - \text{Semaine0}) / \text{Semaine0}) * 100$ . Il faut noter qu'au début du protocole (semaine 0), les souris, tous groupes confondus, présentent un poids corporel relativement identique (NS). Une augmentation progressive du poids corporel est observée dans tous les groupes d'animaux. Cependant, nous observons que les poids corporels des souris STD et LFD évoluent parallèlement et de manière très similaire tout au long du protocole expérimental avec un poids respectif de  $30,9 \pm 0,8$  g et de  $31,2 \pm 0,8$  g (NS) à la semaine 16. Ces résultats sont cohérents avec une évolution naturelle de la masse corporelle liée à l'âge. Les poids corporels de ces deux groupes ont ainsi augmenté d'approximativement 40 % entre la semaine 0 et la semaine 16. Les souris HFD, quant à elles, se distinguent rapidement des deux autres groupes. En effet, une différence significative est visible dès la semaine 4 entre le groupe HFD et les deux autres groupes. Le poids corporel continue à augmenter au cours du protocole et ce, jusqu'à la semaine 16. Les résultats indiquent qu'entre la semaine 0 et la semaine 16, les souris du groupe HFD ont pris plus de 100 % de leur poids initial. Les souris du groupe HFD ont donc développé une masse corporelle significativement plus élevée que les souris LFD ( $31,2 \pm 0,8$  g pour la condition LFD versus  $51,2 \pm 0,7$  g pour la condition HFD ;  $P < 0,001$ ). Ce résultat est également illustré par les planches 1A et B où l'on peut observer une corpulence beaucoup plus forte chez les souris HFD par comparaison avec les souris LFD. De plus, la dissection des animaux obèses a révélé une augmentation significative de tissu adipeux dans la cavité péritonéale ainsi qu'en périphérie des organes vitaux (Planche 1C). Tous ces résultats confirment que les souris nourries avec le régime HFD sont devenues obèses au terme du protocole expérimental.

### **1.2 Variation des valeurs de glycémie**

---

L'une des caractéristiques principales du développement de l'obésité est l'apparition progressive d'un diabète de type 2 se traduisant par une augmentation des concentrations en glucose dans le sang. Dès lors, la glycémie a été mesurée individuellement à chaque point temporel du protocole après une mise à jeun de 6 heures. La figure 14B montre l'évolution de

la glycémie en fonction du temps chez les trois groupes expérimentaux STD, LFD et HFD. Les valeurs obtenues sont exprimées en mg/dl. La concentration sanguine en glucose en condition STD et LFD ne varient pas ou très peu au cours du protocole expérimental. Notons cependant qu'une légère distinction est observée entre les profils d'évolution de la glycémie du groupe STD et du groupe LFD. En effet, dès la première semaine de mesure, le groupe LFD présente une glycémie légèrement plus élevée que le groupe STD (NS). Cette différence se maintient jusqu'à la semaine 16 mais n'est significative que pour la semaine 8 et 16 ( $P < 0,05$ ). Ces résultats suggèrent donc qu'un régime riche en glucose (LFD) a potentiellement un impact sur la glycémie. Concernant les souris du groupe HFD, une augmentation linéaire de la glycémie est observée. Tout comme le poids corporel, la glycémie est significativement plus élevée chez les souris HFD que chez les souris LFD et STD et cela, dès la semaine 4 du protocole ( $P < 0,05$ ). A la semaine 16, les souris HFD présentent une glycémie moyenne respective de  $207,6 \pm 12,1$  mg/dl tandis que les souris du groupe STD et LFD présentent une glycémie moyenne respective de  $108,8 \pm 5,8$  mg/dl et de  $130,1 \pm 6,5$  mg/dl, respectivement ( $P < 0,001$ ). Ces résultats indiquent qu'un régime HFD perturbe le métabolisme du glucose se traduisant par une variation de la glycémie.



**Figure 14.** Evolution temporelle du poids corporel des souris au cours du protocole expérimental (A). Evolution temporelle de la glycémie des souris après une mise à jeun de 6 heures (B) en fonction du régime alimentaire. Les différents groupes sont illustrés comme suit : groupe STD = cercle (n=10) ; groupe LFD = carré (n=12) ; groupe HFD = triangle (n=13). Les résultats sont exprimés en pourcentage (A) et en mg/dl (B). Les valeurs correspondent aux moyennes  $\pm$  SEM. La signification statistique a été analysée par two-way ANOVA suivi d'un post test de Newman-Keuls. \*  $P \leq 0,05$  versus STD ; +  $P \leq 0,05$  versus LFD.

### 1.3 Variation du poids des organes et données métaboliques

Afin d'évaluer l'hypertrophie des tissus, les reins, le foie et le cœur ont été prélevés et pesés à la fin du protocole expérimental. De plus, les concentrations plasmatiques de l'adiponectine, des acides gras non-estérifiés (non-esterified fatty acids – NEFA) ainsi que la quantité d'eau et de nourriture ingérées ont été mesurés à la semaine 16 dans les différents

groupes expérimentaux. Les données obtenues pour chacun de ces paramètres sont illustrées dans le Tableau 1.

Chez les souris appartenant au groupe STD et LFD, aucun des paramètres précités ne présentent de différence significative. Par contre, lorsque les souris sont nourries avec un régime HFD, une augmentation significative du poids des reins ainsi que celui du foie et du coeur est observée par comparaison aux groupes STD et LFD ( $P < 0,05$ ). Ces résultats indiquent qu'un régime HFD induit une hypertrophie de ces organes. A la semaine 16 du protocole expérimental, il apparaît que les souris du groupe STD mangent significativement plus que les souris des deux autres groupes expérimentaux. En revanche, l'ingestion d'eau est similaire entre les 3 groupes expérimentaux.

Les concentrations plasmatiques des NEFAs sont relativement similaires entre les groupes STD et LFD (NS) mais sont significativement plus élevées chez les souris du groupe HFD comparé aux groupes LFD et STD ( $P < 0,01$ ). Concernant l'adiponectine, les concentrations plasmatiques moyennes sont plus faibles chez les souris HFD que chez les souris du groupe LFD et STD, mais il n'y a néanmoins pas de différence significative entre les trois groupes expérimentaux.

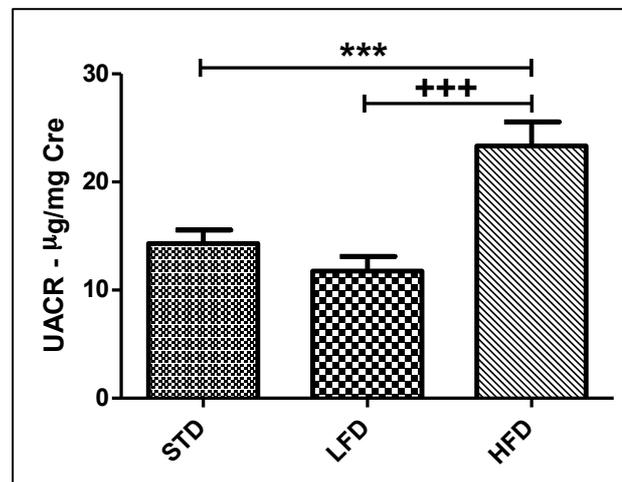
	STD (n=10)	LFD (n=10)	HFD (n=13)
<b>Poids du rein droit (mg/mm de longueur du tibia)</b>	15,1 ± 0,2	14,0 ± 0,6	18,3 ± 0,3* <sup>+</sup>
<b>Poids du foie (mg/mm de longueur du tibia)</b>	71,9 ± 2,8	66,4 ± 4,2	115,6 ± 5,4* <sup>+</sup>
<b>Poids du coeur (mg/mm de longueur du tibia)</b>	7,3 ± 0,2	6,6 ± 0,3	8,3 ± 0,1* <sup>+</sup>
<b>Quantité d'eau ingérée – (ml/24h)</b>	3,8 ± 0,4	3,3 ± 0,2	3,1 ± 0,2
<b>Quantité de nourriture ingérée – (g/24h)</b>	7,2 ± 0,1	5,5 ± 0,3*	5,3 ± 0,2*
<b>Concentration plasmatique en NEFA – (nM)</b>	1300 ± 115	1463 ± 135	2245 ± 201* <sup>+</sup>
<b>Concentration en plasmatique en adiponectine - (µg/ml)</b>	13,3 ± 1,5	15,9 ± 2,4	10,0 ± 1,2

**Tableau 1.** Récapitulatif de divers paramètres métaboliques étudiés au sein des différents groupes expérimentaux à la semaine 16. Valeurs des poids moyens des reins, du foie et du coeur, valeurs de la quantité d'eau ingérée, de la quantité de nourriture ingérée, et valeurs des concentrations plasmatiques en adiponectine et en acides gras non-estérifiés (NEFA). Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM. Les analyses statistiques ont été réalisées par un one-way ANOVA suivi d'un post test de Newman-Keuls. \*  $P \leq 0,05$  versus STD. +  $P \leq 0,05$  versus LFD.

#### 1.4 Variation de l'albuminurie

Afin d'évaluer l'impact d'un régime riche en graisses sur la fonction rénale, les concentrations urinaires de l'albumine ont été analysés à la semaine 16 dans les trois groupes expérimentaux et sont illustrées à la figure 15. L'analyse des données montre que les résultats ne sont pas différents entre les groupes STD et LFD (NS) ( $14,3 \pm 1,2$  µg et  $11,8 \pm 1,4$  µg albumine/mg de créatinine dans les groupes STD et LFD, respectivement). Avec une valeur

moyenne de  $23,3 \pm 2,2$   $\mu\text{g}$  albumine/mg Cre, le groupe HFD présente une albuminurie significativement plus élevée comparée aux deux autres groupes expérimentaux ( $P < 0,001$ ). Ces données suggèrent qu'un régime HFD induit une altération de la fonction rénale. Notons que les valeurs d'albuminurie sont présentées sous forme d'un ratio normalisé par la concentration en créatinine urinaire afin de prendre en compte les variations de la diurèse.



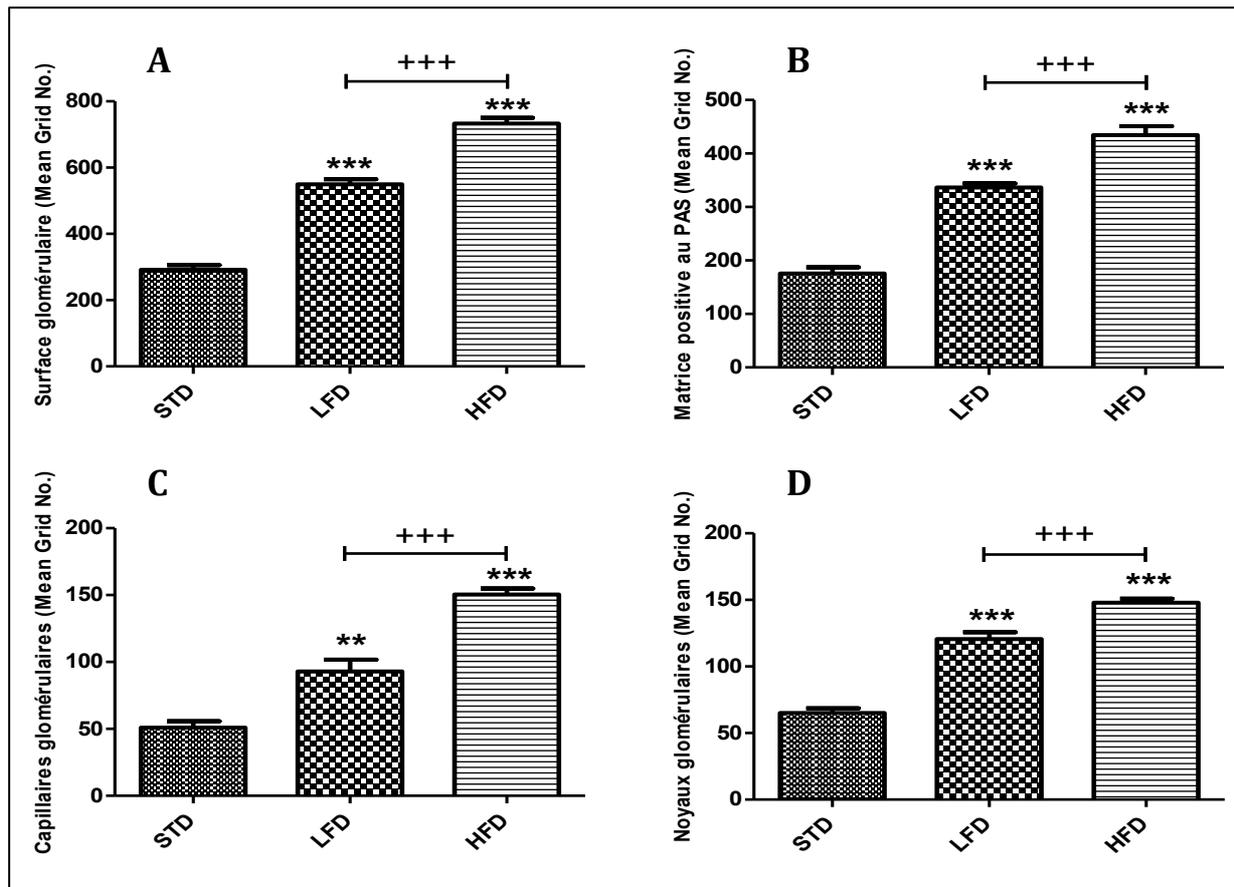
**Figure 15.** Effet des différents types de régimes alimentaires sur le ratio albumine/créatinine à la semaine 16 pour les conditions STD (n=9), LFD (n=12) et HFD (n=13). Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM. La signification statistique a été analysée par one-way ANOVA suivi d'un post test paramétrique de Newman-Keuls. \*  $P \leq 0,05$  versus STD ; +  $P \leq 0,05$  versus LFD.

### 1.5 Evaluation de l'effet de l'obésité sur l'histologie glomérulaire

Après avoir caractérisé notre modèle expérimental au niveau fonctionnel (obésité, hypertrophie des organes, ainsi que l'altération de la fonction rénale), l'un des objectifs du mémoire visait à évaluer l'impact d'un régime riche en graisses sur l'histologie rénale, notamment au niveau des glomérules. Pour ce faire, les tissus rénaux prélevés ont subi divers traitements permettant des analyses histologiques (déshydratation puis enrobage en paraffine). Les coupes obtenues ont été colorées au PAS permettant de mettre en évidence les altérations tissulaires. Comme décrit dans la méthodologie, pour chaque individu, 15 glomérules ont été photographiés. Un scoring a ensuite été réalisé afin de déterminer les éventuelles modifications de la matrice glomérulaire (augmentation du nombre de noyaux, augmentation de la surface capillaire ou encore expansion de la matrice mésangiale). Les photographies de glomérules représentatifs de chaque groupe sont illustrées dans la planche 2. En termes de morphologie, les glomérules des souris STD présentent un aspect normal, sans anomalie apparente (Planche 1A, B, C). Chez les souris du groupe LFD, les glomérules présentent, pour la majorité d'entre eux, un aspect similaire à celui observé chez les souris STD (Planche 2D). Cependant, quelques-uns montrent certaines anomalies, telles qu'un épaississement de la capsule de Bowman (Flèches Planche 2 E, F), des capillaires dilatés (Flèches Planche 2F), ou une accumulation de la matrice mésangiale (Asterix Planche 2 E, F). Ces anomalies sont facilement détectables par l'accumulation de matrice positive au PAS au sein du mésangium. Notons de plus, que pour nombre d'entre eux, les glomérules présentaient également un volume plus important et une capsule de Bowman dilatée par comparaison avec les glomérules de souris STD. Ces altérations que l'on retrouve en beaucoup plus grande proportion chez les souris HFD indiquent qu'un régime riche en hydrates de carbone peut également constituer un facteur important dans l'apparition de lésions rénales. Dès lors, chez les souris du groupe HFD, les

mêmes types de glomérules que ceux présents chez les souris LFD sont observables, néanmoins ceux-ci présentent des lésions plus importantes et plus étendues. Ainsi, des glomérules de grande taille avec une accumulation de matrice mésangiale (\*), des capillaires dilatés et une capsule de Bowman dilatée ont été observés (Flèches, Planche 2G-K). Dans le groupe HFD, une importante accumulation de matrice au niveau du pôle vasculaire du glomérule est également visible (Flèches, Planche 2H, I). De plus, un grand nombre de glomérules du même groupe présentaient des signes de glomérulosclérose illustrée par un important épaissement de la capsule de Bowman (Planche 2H, I, J).

Un scoring semi-quantitatif de l'expansion de la matrice mésangiale a été réalisé sur 15 glomérules par souris. Les résultats issus de ce scoring sont illustrés à la figure 16. L'augmentation significative de la matrice glomérulaire chez les souris HFD est caractérisée par une expansion de la matrice mésangiale (PAS positif), une augmentation du nombre de noyaux ainsi qu'une augmentation de la surface de filtration capillaire par comparaison aux souris LFD et aux souris STD (Figure 16 A-D) ( $P < 0,05$ ). Cependant, il est important de prendre en compte le fait que les souris LFD présentent également une augmentation de l'expansion de la matrice mésangiale, de la surface glomérulaire, des noyaux et des vaisseaux sanguins par rapport au contrôle.



**Figure 16.** Analyse quantitative de la surface glomérulaire à la semaine 16 pour les conditions STD (n=9), LFD (n=12) et HFD (n=13). L'analyse comprend l'évaluation de la surface glomérulaire (A) l'évaluation de la matrice mésangiale (B) l'évaluation de la surface de filtration capillaire (C) ainsi que l'évaluation du nombre de noyaux (D). Les résultats sont présentés en moyennes  $\pm$  SEM. La signification statistique a été analysée par un one-way ANOVA suivi d'un post test de Newman-Keuls. \*  $P \leq 0,05$  versus STD ; +  $P \leq 0,05$  versus LFD.

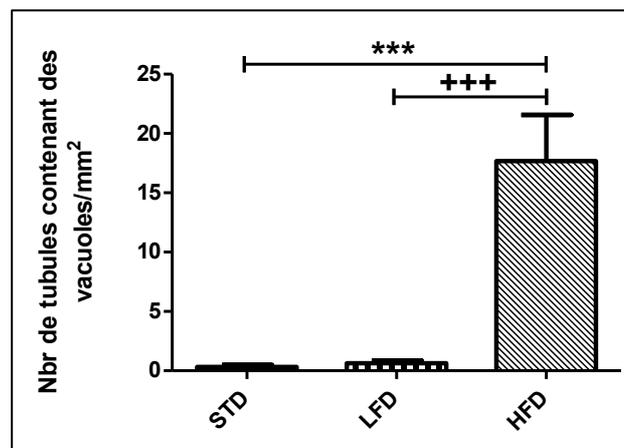
## 1.6 Evaluation de l'effet de l'obésité sur l'histologie tubulaire

L'impact d'un régime riche en graisses sur l'histologie tubulaire a ensuite été évalué sur des coupes de reins fixés en paraffine et colorés avec du PAS. Dans les groupes STD et LFD, aucune anomalie tubulaire n'a été relevée. Par contre, chez les souris HFD, nous avons observé la présence d'un grand nombre de cellules tubulaires contenant des vacuoles, ces cellules étant principalement localisées dans le cortex, et plus spécifiquement encore, dans les segments S1 et S2 du tubule proximal (Planche 3). En effet, l'immunomarquage de la NEP, un marqueur spécifique de la bordure en brosse des segments S3, nous a permis de confirmer que les cellules tubulaires vacuolées sont majoritairement localisées dans les segments S1 et S2 des tubules proximaux et non les S3 (Planche 4). Nous pouvons voir que les segments S3, localisés dans la couche externe de la médulla externe (OSOM), caractérisés par une bordure en brosse très dense (coloration au PAS très marquée) ne montrent aucun signe de vacuolisation.

Comme illustré dans la Planche 3I D-F, l'espace intracellulaire de nombreuses cellules tubulaires proximales semble être complètement envahi par ces vacuoles. Ces cellules vacuolées présentent également une perte de leur bordure en brosse comme attesté par la perte de marquage de l'aquaporine-1 (Planche 3II E-H). En effet, afin d'évaluer l'intégrité de la bordure en brosse des cellules des tubules proximaux des souris HFD, nous avons réalisé l'immunomarquage de l'aquaporine-1 sur des coupes de reins provenant d'animaux appartenant

aux groupes expérimentaux LFD et HFD. Cette protéine membranaire est spécifiquement localisée dans la bordure en brosse des tubules proximaux. Chez les souris LFD, le marquage révèle une bordure en brosse intègre et occupant la quasi-totalité de la lumière du tubule (Planche 3II A-D). Ces résultats indiquent que les cellules tubulaires sont saines et fonctionnelles. En revanche, chez les souris HFD, les tubules présentent de nombreuses vacuoles comme décrit précédemment. Ces vacuoles perturbent l'intégrité du tubule et les altérations cellulaires induites par leur présence se traduisent entre autres par une perte de la bordure en brosse visible via l'absence d'aquaporine-1 au pôle apical de ces cellules.

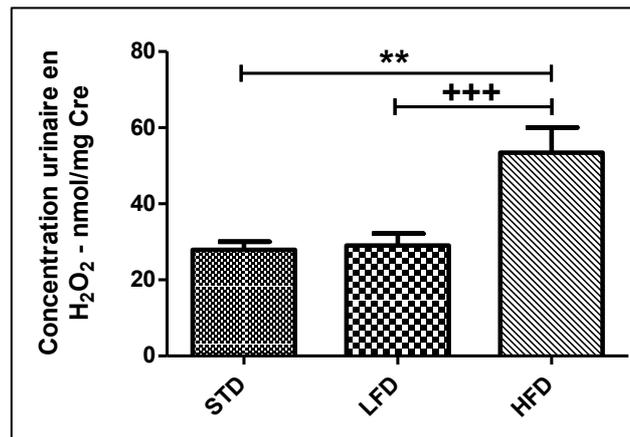
La semi-quantification du nombre de tubules contenant des vacuoles révèle que seules quelques vacuoles sont présentes chez les souris STD et LFD. Au contraire, une augmentation significative du nombre de tubules contenant des vacuoles est mesurée chez les souris HFD comparé aux deux autres groupes expérimentaux ( $P < 0,001$ ) (Figure 17).



**Figure 17.** Analyse semi-quantitative du nombre de tubules contenant des vacuoles par  $\text{mm}^2$  à la semaine 16 pour les conditions STD ( $n=9$ ), LFD ( $n=12$ ) et HFD ( $n=13$ ). Les résultats sont présentés en moyennes  $\pm$  SEM. La signification statistique a été analysée par un one-way ANOVA suivi d'un post test de Newman-Keuls. \*  $P \leq 0,05$  versus STD ; +  $P \leq 0,05$  versus LFD.

### 1.7 Variation de l'excrétion urinaire en hydrogène peroxyde ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

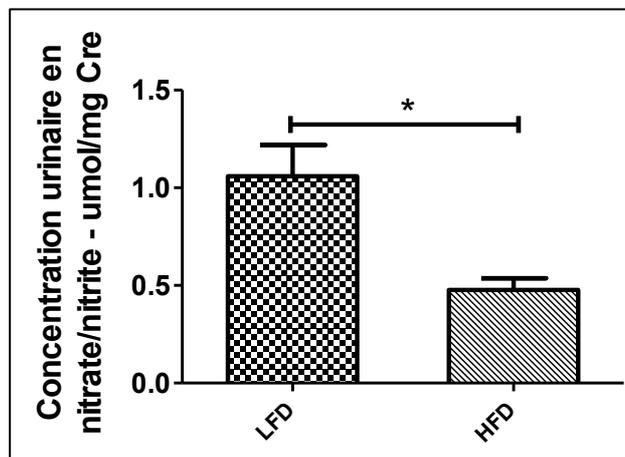
Afin d'évaluer si le régime HFD affecte les marqueurs du stress oxydatif, les concentrations en peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ont été mesurées dans les urines des souris STD, LFD et HFD à la semaine 16 du protocole expérimental. Comme l'illustre la figure 18, le régime HFD induit une augmentation significative des concentrations urinaires en  $\text{H}_2\text{O}_2$  en comparaison aux deux autres groupes expérimentaux STD et LFD ( $53,4 \pm 6,6$  nmol/mg de créatinine pour le groupe HFD versus  $27,9 \pm 2,2$  et  $29,0 \pm 3,1$  nmol/mg de créatinine pour les groupes STD et LFD, respectivement ;  $P < 0,01$ ).



**Figure 18.** Impact de l'obésité sur l'excrétion d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ mg Cre à la semaine 16 pour les conditions STD (n=9), LFD (n=12) et HFD (n=13). Les résultats sont présentés en moyennes ± SEM. La signification statistique a été analysée par un one-way ANOVA suivi d'un post test de Newman-Keuls. \*  $P \leq 0,05$  versus STD ; +  $P \leq 0,05$  versus LFD.

### 1.8 Effet de l'obésité sur l'excrétion urinaire des nitrites/nitrates (NOx)

Afin d'évaluer l'impact de l'obésité sur la production de NO, nous avons examiné les concentrations urinaires des nitrites/nitrates (NOx) dans les groupes LFD et HFD et ce, à la semaine 16. Comme l'illustre la Figure 19, ces deux groupes présentent des différences, caractérisées par une diminution significative observée chez les souris HFD ( $P < 0,01$ ). Les valeurs moyennes des concentrations urinaires de NOx sont de  $0,5 \pm 0,1$   $\mu\text{mol/mg}$  de créatinine pour les LFD et de  $1,1 \pm 0,2$   $\mu\text{mol/mg}$  de créatinine pour les HFD.



**Figure 19.** Effet de l'obésité sur les concentrations urinaires de nitrites/nitrates à la semaine 16 pour les conditions LFD (n=12) et HFD (n=13). Les résultats sont présentés en moyennes ± SEM. La signification statistique a été analysée par un t-test non-pairé. \*  $P \leq 0,05$  versus LFD.

## Partie 2. Effets du L-NIL sur le métabolisme du NO dans un modèle d'insuffisance rénale induite par l'obésité

---

Cette partie s'intéresse plus particulièrement au métabolisme du NO et vise à évaluer les effets potentiels d'un traitement pharmacologique basé sur l'administration orale de L-NIL chez des animaux atteints d'obésité. Pour rappel, le L-NIL est un inhibiteur spécifique de la iNOS, une enzyme produisant du NO aux propriétés inflammatoires et cytotoxiques. Pour ce faire, des animaux LFD et HFD ont été traités avec le L-NIL dans l'eau de boisson dès la première semaine d'alimentation différenciée. Divers paramètres, précédemment décrits dans la partie A « caractérisation de l'obésité », ont été mesurés chez ces animaux. Ces groupes expérimentaux seront comparés aux animaux STD, LFD et HFD étudiés dans la partie A.

### 2.1 Variation de l'augmentation relative du poids corporel (%)

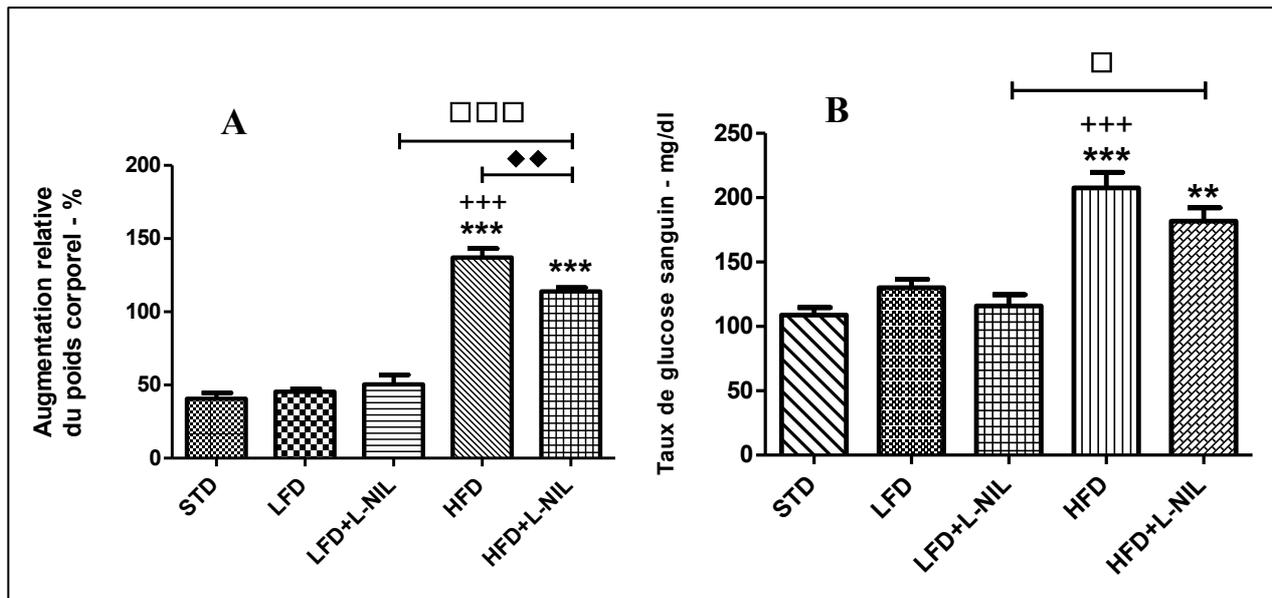
---

L'augmentation relative du poids corporel, illustrée dans la figure 20A, ne présente aucune différence significative entre les souris des groupes STD, LFD et LFD+L-NIL. Ces trois groupes de souris ont vu leur poids augmenter de  $40,5 \pm 4,1$  % (STD), de  $45,3 \pm 2,0$  % (LFD) et enfin de  $50,3 \pm 6,5$  % (LFD+L-NIL), respectivement entre le début du protocole expérimental et la semaine 16 (NS). En revanche, les résultats démontrent une diminution significative de la prise de poids chez les animaux HFD traités avec du L-NIL en comparaison avec celle des souris HFD non traitées. En effet, alors que le poids des souris HFD augmente de  $137,1 \pm 6,1$  %, le poids des souris HFD+L-NIL n'augmente que de  $113,9 \pm 2,7$  % ( $P < 0,01$ ). Au terme de la procédure expérimentale, les souris du groupe HFD+L-NIL présentaient un poids moyen de  $33,7 \pm 1,9$  g, ce qui est significativement inférieur à celui des animaux HFD ( $P < 0,01$ ). En résumé, l'utilisation de cet agent pharmacologique permet de prévenir ou de ralentir partiellement la prise de poids chez des souris soumises à un régime riche en graisses. Notons cependant que la réduction du poids observée n'atteint pas le seuil de la valeur contrôle relative aux groupes LFD et STD.

### 2.2. Variation des valeurs de glycémie

---

La figure 20B illustre les valeurs de glycémie (mg/dl) dans chaque groupe expérimental à la semaine 16. Chez les souris des groupes STD, LFD, LFD+L-NIL, les différences sont non significatives, indiquant que les régimes ou le traitement pharmacologique n'induisent pas d'effets sur ce paramètre. Ainsi, les valeurs sont de  $108,8 \pm 5,5$  mg/dl pour le groupe STD, de  $130,1 \pm 6,5$  mg/dl pour le groupe LFD et de  $116,0 \pm 8,5$  mg/dl pour le groupe LFD+L-NIL (NS). Comme observé auparavant dans la première partie des résultats, les souris HFD présentent une glycémie significativement plus élevée que les souris ayant suivi un régime STD ou LFD ( $P < 0,001$ ). Au sein des groupes de souris ayant été nourries avec le régime HFD, la glycémie est plus faible chez celles ayant été traitées avec du L-NIL par rapport au groupe HFD ( $181,8 \pm 10,5$  mg/dl chez les souris HFD+L-NIL *versus*  $207,6 \pm 12,1$  mg/dl chez les souris HFD ;  $P < 0,01$ ). Néanmoins, cette diminution est non significative d'un point de vue statistique.



**Figure 20.** Augmentation relative du poids corporel des souris au cours du protocole en fonction du régime alimentaire et du traitement au L-NIL à la semaine 16 (A). Concentration sanguine en glucose au sein des différents groupes expérimentaux à la semaine 16 (B). STD, n=10 ; LFD, n=12 ; HFD, n=13 ; LFD+L-NIL, n=6 ; HFD+L-NIL, n=8. Les résultats sont exprimés en pourcent et correspondent aux moyennes  $\pm$  SEM. La signification statistique a été analysée par un one-way ANOVA suivi d'un post-test de Newman-Keuls. \*  $P \leq 0,05$  versus STD ; +  $P \leq 0,05$  HFD versus LFD ; □  $P \leq 0,05$  HFD+L-NIL versus LFD+L-NIL ; ◆  $P \leq 0,05$  HFD+L-NIL versus HFD.

### 2.3 Variation du poids des organes

La partie supérieure du Tableau 2 reprend les poids moyens des reins, du foie et du cœur exprimés en mg et rapportés à la longueur du tibia (mm) dans chaque groupe expérimental.

La comparaison des valeurs de poids du rein chez les groupes de souris nourries soit avec la STD ou la LFD +/- L-NIL ne révèle aucune différence significative entre ces groupes (NS). Comme démontré précédemment, le régime HFD provoque une augmentation significative du poids du rein par rapport au groupe STD ou LFD ( $P < 0,05$ ). Par contre, le traitement avec du L-NIL ne permet pas de prévenir cette augmentation. L'agent pharmacologique n'atténue donc pas l'hypertrophie de l'organe.

Au niveau du tissu hépatique, aucune différence significative n'est observée entre les souris STD, LFD et LFD+L-NIL. Par contre, le poids du foie des souris HFD et HFD+L-NIL est significativement plus élevé que celui des souris STD et LFD +/-L-NIL ( $P < 0,001$ ), confirmant l'apparition d'une hypertrophie de l'organe en condition HFD. Il apparaît même que le traitement L-NIL augmente significativement plus le poids du tissu hépatique par rapport au groupe HFD non traité ( $P > 0,01$ ).

Les valeurs de poids du cœur chez les souris HFD et HFD+L-NIL sont significativement plus élevées que chez les souris STD, LFD ou encore LFD+L-NIL. Le traitement avec du L-NIL ne permet donc pas de prévenir cette hypertrophie cardiaque.

	STD (n=10)	LFD (n=12)	LFD+L- NIL (n=6)	HFD (n=13)	HFD +L-NIL (n=8)
<b>Poids du rein droit (mg/mm de longueur du tibia)</b>	15,1 ± 0,2	14,0 ± 0,6	13,9 ± 0,5	18,3 ± 0,3 *** +++	17,7 ± 1,5 *** □□
<b>Poids du foie (mg/mm de longueur du tibia)</b>	72,0 ± 0,4	66,4 ± 4,3	59,7 ± 6,6	115,6 ± 23,4 *** +++	141,5 ± 8,5 *** □□□ ◆◆
<b>Poids du cœur (mg/mm de longueur du tibia)</b>	7,3 ± 0,2	6,6 ± 0,3	6,3 ± 0,3	8,3 ± 0,1 * +++	0,0086 ± 0,0003 * □□
<b>Quantité d'eau ingérée - (ml/24h)</b>	3,8 ± 0,4	3,3 ± 0,2	3,4 ± 0,2	3,1 ± 0,2	2,8 ± 0,2
<b>Quantité de nourriture ingérée - (g/24h)</b>	7,2 ± 0,1	5,5 ± 0,2 ***	5,6 ± 0,0 ***	5,3 ± 0,2 ***	5,5 ± 0,0 ***
<b>Concentration plasmatique en NEFA- (nM)</b>	1300 ± 115	1463 ± 135	1636 ± 292	2245 ± 201 ** ++	1568 ± 207
<b>Concentration plasmatique en adiponectine - (µg/ml)</b>	13,3 ± 1,5	15,9 ± 2,4	14,1 ± 2,0	10,0 ± 1,2	6,8 ± 0,9
<b>UACR (µg/mg Cre)</b>	14,3 ± 1,2	11,8 ± 1,4	15,3 ± 2,2	23,3 ± 2,2 ** ++	20,2 ± 2,2

**Tableau 2.** Récapitulatifs des divers paramètres métaboliques étudiés au sein des différents groupes expérimentaux à la semaine 16. Valeurs des poids moyens des reins, du foie et du cœur, valeurs de la quantité d'eau ingérée, de la quantité de nourriture ingérée, valeurs des concentrations plasmatiques en adiponectine et en acide gras non-estérifiés (NEFA). Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM. Les analyses statistiques ont été réalisées par one-way ANOVA suivi d'un post test de Newman-Keuls. \*  $P \leq 0,05$  versus STD ; +  $P \leq 0,05$  HFD versus LFD ; □  $P \leq 0,05$  HFD+L-NIL versus LFD+L-NIL ; ◆  $P \leq 0,05$  HFD+L-NIL versus HFD.

## 2.4 Variation de la quantité d'eau et de nourriture ingérées

Comme observé précédemment, la quantité d'eau ingérée en 24h est similaire et ce, quel que soit le groupe expérimental. Quant à la prise de nourriture, comme exposé dans la première partie des résultats, les souris du groupe STD mangent significativement plus que les autres groupes expérimentaux LFD ou HFD +/- L-NIL ( $P < 0,001$ ). Dans ces derniers groupes, aucune différence significative n'a été observée.

## **2.5 Variation de la concentration plasmatique en acides gras non estérifiés (NEFA)**

---

Les concentrations plasmatiques de NEFA mesurées dans chaque groupe expérimentale à la semaine 16 sont exprimées en nM et sont illustrées dans le Tableau 2. Comme déjà mentionné précédemment, un régime HFD induit une augmentation significative de la concentration plasmatiques en NEFA en comparaison aux deux groupes STD et LFD ( $P < 0,01$ ), dont les valeurs sont sensiblement similaires. Les valeurs obtenues dans les groupes de souris nourries avec une nourriture LFD ne sont pas influencées par le traitement pharmacologique utilisé puisqu'aucune différence statistique n'est observée entre ces différents groupes (LFD vs LFD+L-NIL, NS). Cependant nous pouvons constater que lorsque les souris sont nourries avec un régime HFD et sont traitées avec du L-NIL, l'augmentation de la concentration plasmatique en NEFA induite en condition HFD est diminuée. Malgré cette observation, les analyses statistiques ne révèlent aucune différence statistique entre ces deux groupes (NS).

## **2.6 Variation de la concentration plasmatique en adiponectine**

---

Tout comme pour les NEFA, l'adiponectine a été dosée dans les échantillons plasmatiques et ce, dans les différents groupes expérimentaux à la semaine 16. Les valeurs moyennes des concentrations plasmatiques en adiponectine évaluées chez les souris des groupes LFD et STD sont similaires (NS).

Les concentrations plasmatiques en adiponectine chez les souris HFD et HFD+L-NIL sont nettement plus faibles que celles mesurées chez les souris STD, LFD et LFD+L-NIL. Néanmoins, aucune différence significative n'est observée.

## **2.7 Variation de l'albuminurie**

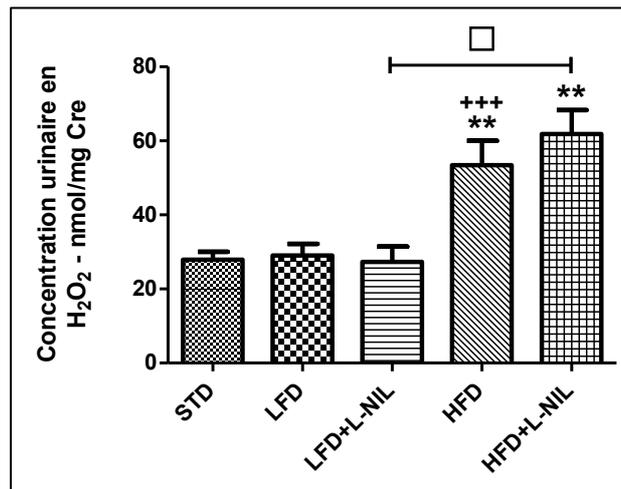
---

Afin d'évaluer les effets d'un traitement avec le L-NIL sur la fonction rénale, l'albuminurie a été mesurée dans les échantillons urinaires prélevés à la semaine 16 du protocole expérimental. Les concentrations urinaires en albumine chez les animaux ayant été traités ou non sont présentées dans la partie inférieure du Tableau 2 et sont exprimées en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de créatinine. Comme reporté précédemment dans la première partie du mémoire, nous pouvons constater une élévation significative de l'albuminurie chez les souris HFD comparé aux conditions STD et LFD. Par contre, l'albuminurie observée dans le groupe HFD+L-NIL ne diffère pas significativement de celles correspondant aux groupes STD, LFD et LFD+L-NIL, bien que ces valeurs soient encore très élevées.

## **2.8 Variation de l'excrétion urinaire en hydrogène peroxyde ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )**

---

Les valeurs moyennes des concentrations urinaires en  $\text{H}_2\text{O}_2$  mesurées chez les différents groupes expérimentaux à la semaine 16 du protocole expérimental sont exprimées en nmol/mg de créatinine et sont illustrées à la figure 21. Les concentrations urinaires sont semblables entre les groupes STD, LFD et LFD+L-NIL ( $27,9 \pm 2,2$  nmol/mg de créatinine (STD),  $29,0 \pm 3,1$  nmol/mg de créatinine (LFD) et  $27,3 \pm 4,1$  nmol/mg de créatinine (LFD+L-NIL) ; NS). Pour rappel, les souris HFD sont caractérisées par une excrétion d' $\text{H}_2\text{O}_2$  plus élevée que les souris LFD et STD ( $P < 0,001$ ). De même, les souris HFD+L-NIL présentent une augmentation significative par comparaison aux souris STD ou encore LFD+L-NIL.

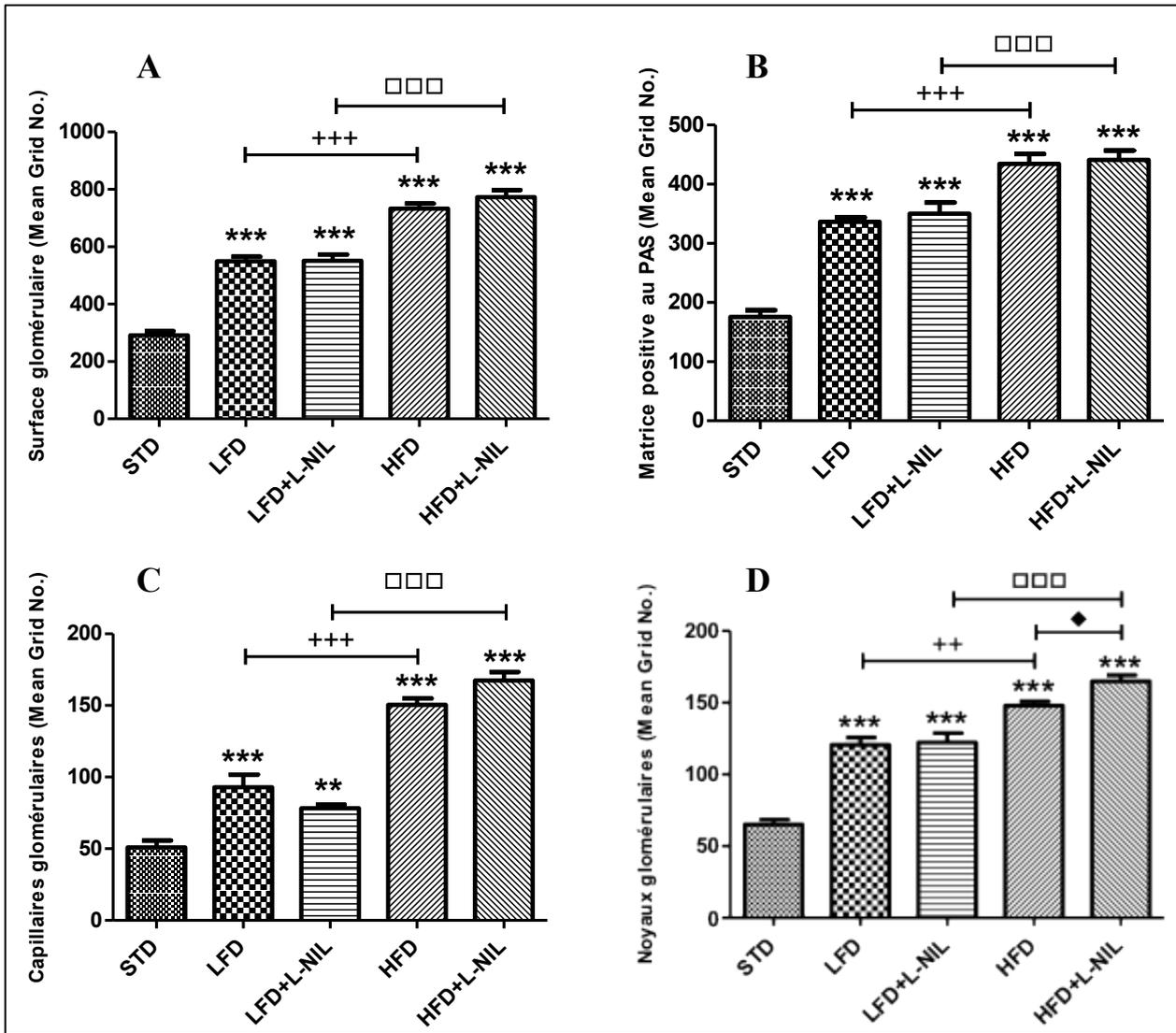


**Figure 21.** Evaluation des l'excrétion d' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ mg Cre en fonction du régime et du traitement à la semaine 16. STD, n=10 ; LFD, n=12 ; HFD, n=13 ; LFD+L-NIL, n=6 ; HFD+L-NIL, n=8. Les résultats sont présentés en moyennes  $\pm$  SEM. La signification statistique a été analysée par one-way ANOVA suivi d'un post test de Newman-Keuls. \*  $P \leq 0,05$  versus STD ; +  $P \leq 0,05$  HFD versus LFD ;  $\square P \leq 0,05$  HFD+L-NIL versus LFD+L-NIL.

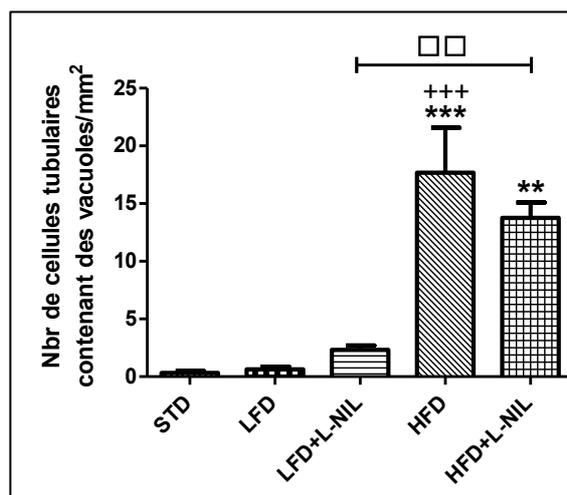
## 2.9 Évaluation de l'effet du L-NIL sur les atteintes glomérulaires et tubulaires

Comme déjà décrit dans la première partie des résultats, les glomérules des souris HFD sont caractérisés par une hypertrophie glomérulaire, par une augmentation de leur matrice mésangiale, du nombre de noyaux ainsi que d'une dilatation des capillaires. Comme nous pouvons le voir à la Figure 22, le traitement à l'aide de L-NIL induit très peu de variations dans le comptage de ces différents éléments. La seule différence notable est une augmentation significative du nombre de noyaux en condition HFD. Mais de manière générale, les résultats semblent indiquer que le L-NIL n'influence pas la morphologie des glomérules.

Comme illustré à la figure 23 les valeurs de la quantification du nombre de cellules tubulaires proximales contenant des vacuoles entre le groupe HFD et les groupes nourris avec la nourriture LFD sont significativement différentes. Pour rappel, dans les tubules proximaux les lésions, liées à l'obésité sont caractérisées par une augmentation du nombre de cellules tubulaires vacuolisées. En effet, nous pouvons observer que les tissus rénaux des souris provenant des groupes HFD non traités présentent un nombre significativement plus élevé de cellules tubulaires proximales vacuolisées en comparaison avec tous les groupes LFD, traités ou non et le groupe STD ( $P < 0,001$ ). Les résultats de la quantification indiquent que l'agent pharmacologique utilisé n'induit aucune différence statistique du nombre de cellules vacuolisées chez les souris LFD+L-NIL en comparaison avec les souris du groupe contrôle LFD si ce n'est une légère élévation ( $2,3 \pm 0,4$  cellules vacuolées/mm<sup>2</sup> versus  $0,6 \pm 0,2$  cellules vacuolées/mm<sup>2</sup>; NS). Chez les animaux HFD traités à l'aide de L-NIL, l'agent pharmacologique n'induit pas de diminution significative du nombre de cellules tubulaires contenant des vacuoles, malgré une tendance à la réduction de ce paramètre ( $13,8 \pm 1,3$  de cellules vacuolées/mm<sup>2</sup> chez les animaux HFD+L-NIL versus  $17,7 \pm 3,9$  de cellules vacuolées/mm<sup>2</sup> chez les animaux HFD non traités ; NS).



**Figure 22.** Analyse quantitative de la surface glomérulaire en fonction du régime et du traitement à la semaine 16. STD, n=10 ; LFD, n=12 ; HFD, n=13 ; LFD+L-NIL, n=6 ; HFD+L-NIL, n=8. L'analyse comprend l'évaluation de la surface glomérulaire (A) l'évaluation de la matrice mésangiale (B) l'évaluation de la surface de filtration capillaire (C) ainsi que l'évaluation du nombre de noyaux (D). Les résultats sont présentés en moyennes  $\pm$  SEM. La signification statistique a été analysée par un one-way ANOVA suivi d'un post test de Newman-Keuls ; \*  $P \leq 0.05$  versus STD ; +  $P \leq 0.05$  versus LFD ; □  $P \leq 0.05$  HFD+L-NIL versus LFD+L-NIL. ◆  $P \leq 0.05$  HFD+L-NIL versus HFD.



**Figure 23.** Analyse quantitative du nombre de cellules tubulaires proximales contenant des vacuoles par  $\text{mm}^2$  en fonction du régime et du traitement à la semaine 16. STD, n=10 ; LFD, n=12 ; HFD, n=13 ; LFD+L-NIL, n=6 ; HFD+L-NIL, n=8. Les résultats sont présentés en moyennes  $\pm$  SEM. La signification statistique a été analysée par one-way ANOVA suivi d'un post test paramétrique de Newman-Keuls. \*  $P \leq 0,05$  versus STD ; +  $P \leq 0,05$  HFD versus LFD ; □  $P \leq 0,05$  HFD+L-NIL versus LFD+L-NIL.

## 2.10 Localisation et expression de la iNOS

La planche 5 « Détection immunohistochimique de la iNOS » illustre l'expression et la localisation de la iNOS au sein du tissu rénal dans les groupes LFD (A), LFD+L-NIL (C), HFD (B) et HFD+L-NIL (D).

L'enzyme se répartit de manière hétérogène au sein du tissu rénal. En condition LFD, la iNOS est exprimée par les cellules tubulaires proximales et plus précisément, au niveau de la bordure en brosse de ces cellules. Certains tubules sont plus intensément marqués que d'autres. Un faible marquage est parfois observé en périphérie des vaisseaux. Nous retrouvons le même type de marquage chez les animaux HFD non traités. Il ne semble pas y avoir de variation d'expression entre le groupe LFD et HFD ; néanmoins, une analyse quantitative devra être réalisée afin de déterminer si l'un des régimes induit une expression plus importante. Chez les animaux traités avec du L-NIL, nous observons une atténuation significative du marquage de la iNOS chez les animaux LFD mais surtout chez les animaux HFD. Ces observations indiquent que le traitement basé sur l'administration de L-NIL inhibe l'expression de l'enzyme iNOS.

## 2.11 Localisation et expression de la eNOS

La planche 6 « Détection immunohistochimique de la eNOS » illustre l'expression et la localisation de la eNOS au sein du tissu rénal dans les groupes LFD (A), LFD+L-NIL (b), HFD (B) et HFD+L-NIL (D).

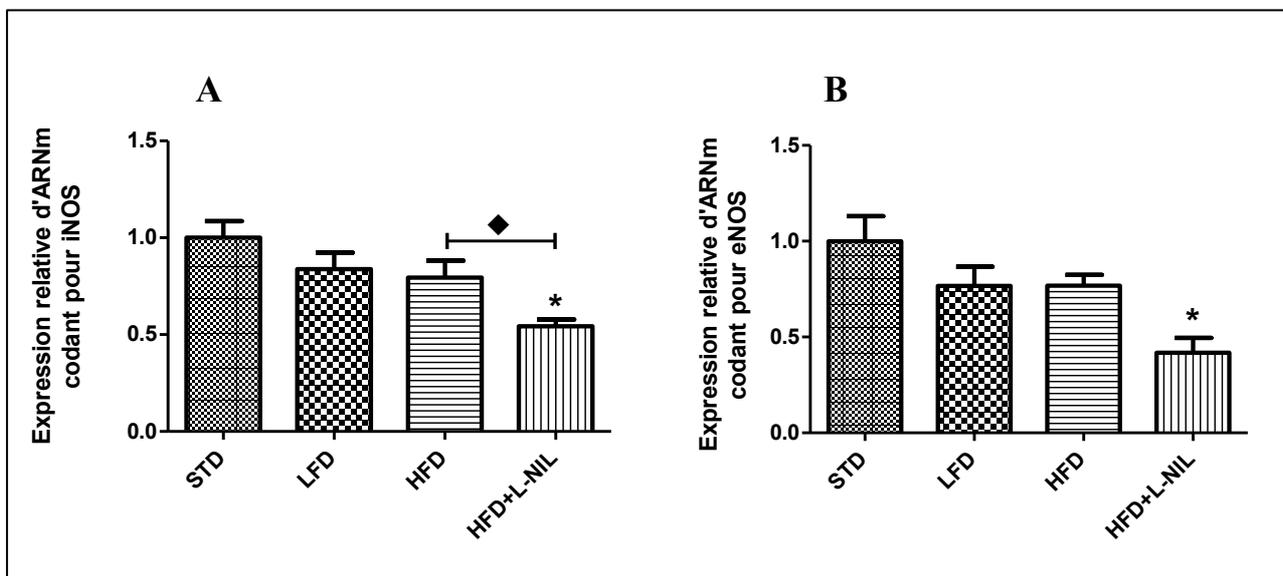
En condition LFD et LFD+L-NIL, le marquage de la eNOS est présent de façon très caractéristique au niveau de la paroi des vaisseaux ainsi que de la bordure en brosse des cellules tubulaires proximales, principalement dans l'OSOM. En condition HFD (non traités et traités avec du L-NIL), nous constatons une diminution significative, voire complète, du marquage de la eNOS au niveau de la bordure en brosse. Il est toutefois possible d'encore détecter une très faible expression de l'enzyme dans la bordure en brosse de quelques tubules. Cependant, les parois des vaisseaux présentent encore une forte expression de la eNOS.

## 2.12 Variation dans le niveau d'expression du gène codant pour la iNOS dans le tissu rénal

Etant donné qu'une inhibition de l'expression de la iNOS a pu être observée en condition LFD et HFD+L-NIL, nous avons voulu investiguer l'expression relative d'ARNm codant pour la iNOS. La figure 23A illustre les variations dans la quantité de ARNm codant pour la iNOS mesurées sur des échantillons tissulaires de rein provenant de souris des groupes STD, LFD, HFD et HFD+L-NIL. Les résultats indiquent qu'un régime HFD n'induit pas de modifications majeures de la production d'ARNm codant pour la iNOS en comparaison avec le groupe STD et LFD. Par contre, dans le groupe HFD traité avec du L-NIL, les taux d'expression du gène codant pour la iNOS sont significativement plus faibles que chez les autres groupes expérimentaux, indiquant que cet agent pharmacologique induit une diminution de la production ARNm codant pour l'iNOS dans le tissu rénal.

## 2.13 Variation dans le niveau d'expression du gène codant pour la eNOS dans le tissu rénal

Afin de vérifier les observations établies précédemment par l'analyse des coupes histologiques, nous avons réalisé une PCR quantitative en temps réel visant à évaluer la quantité d'ARNm codant pour la eNOS produit par le tissu rénal. Comme illustré à la figure 23B. Nous pouvons observer que l'administration orale de L-NIL induit une diminution significative de l'expression relative de la eNOS en comparaison avec le groupe STD. Notons en outre qu'il n'y a pas de différences significatives entre les groupes STD, LFD et HFD ce qui suggère que le régime n'induit pas de perturbations dans l'expression du gène codant pour la eNOS.



**Figure 24.** Expression relative d'ARN messenger codant pour la iNOS (A) et la eNOS (B) dans le tissu rénal en fonction du régime et du traitement à la semaine 16. STD, n=10 ; LFD, n=12 ; HFD, n=13 ; HFD+L-NIL, n=8. Les résultats sont présentés en moyennes  $\pm$  SEM. La signification statistique a été analysée par one-way ANOVA suivi d'un post-test de Newman-Keuls. \*  $P \leq 0,05$  versus STD ; +  $P \leq 0,05$  HFD versus LFD ; ◆  $P \leq 0,05$  HFD+L-NIL versus HFD.

## Partie 3. Étude de l'effet de la myriocine, dans un modèle d'insuffisance rénale induite par l'obésité

---

Cette partie décrit les effets de la myriocine chez des animaux obèses, et particulièrement en ce qui concerne les atteintes tubulaires. En effet, nous avons émis l'hypothèse que les vacuoles observées dans les cellules tubulaires proximales pourraient être associées à une accumulation de lipides dans ces cellules. Pour rappel, la myriocine est un agent interférant avec le métabolisme des lipides via l'inhibition de la synthèse *de novo* de céramide. Le céramide est un lipide connu notamment pour ses propriétés inflammatoires et toxiques. Le groupe HFD+Myriocine sera comparé aux groupes STD, LFD et HFD déjà décrits ultérieurement ainsi qu'à un groupe contrôle LFD+Myriocine.

### 3.1 Variation de l'augmentation relative du poids corporel (%)

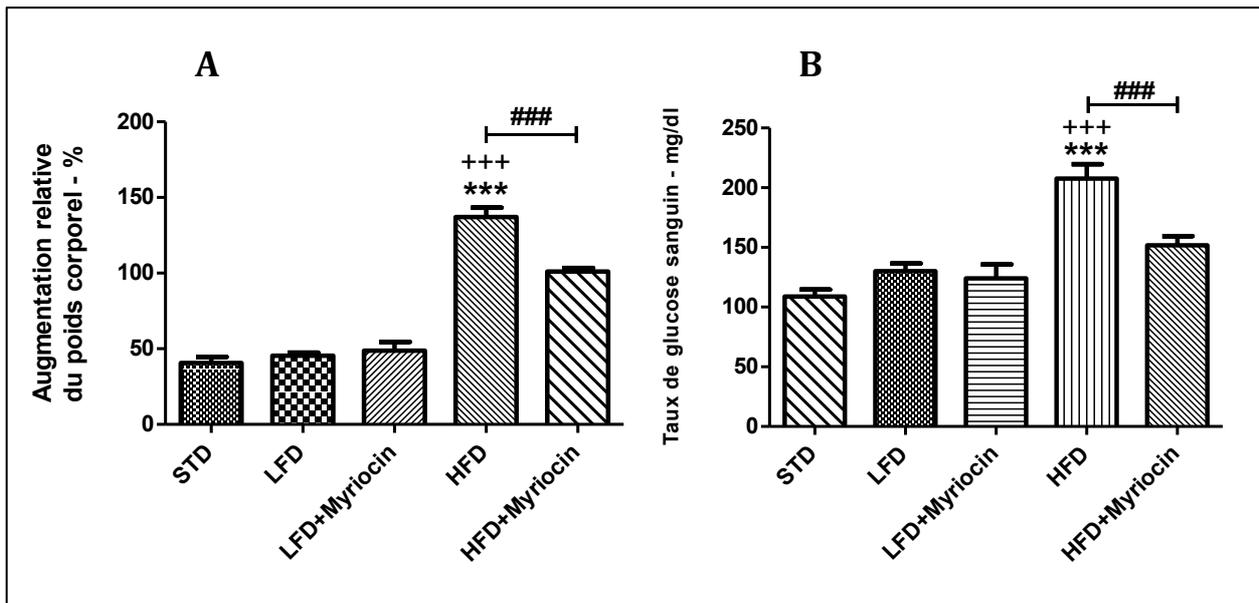
---

L'impact d'un traitement basé sur l'injection de myriocine sur le poids corporel des souris a été évalué par la mesure de l'augmentation relative du poids corporel des souris en référence à celui mesuré en début de protocole expérimental (Figure 25A). Pour rappel, une augmentation significative du poids est observée en condition HFD par comparaison avec les groupes STD et LFD ( $P < 0,001$ ). En ce qui concerne l'augmentation relative du poids corporel en condition LFD, aucune différence significative n'est visible entre le groupe LFD et le groupe LFD+Myriocine (augmentation de  $45,6 \pm 2,0$  % pour le groupe LFD *versus*  $48,8 \pm 5,9$  % pour le groupe LFD+Myriocine ; NS). A la 16<sup>ème</sup> semaine de la procédure expérimentale, ces différents groupes (STD, LFD, LFD+Myriocine) ont atteint un poids moyen de  $30,9 \pm 0,8$  g,  $31,2 \pm 0,8$  g et de  $35,2 \pm 0,8$  g respectivement. En condition HFD, le traitement pharmacologique limite la prise de poids. En effet, en condition HFD, le poids des souris augmente de  $137,1 \pm 6,1$  %, alors que celui des souris traitées à la myriocine augmente de  $101,1 \pm 2,3$  %, ce qui représente une différence statistiquement significative ( $P < 0,001$ ). A la fin du protocole, les poids respectifs moyens des souris HFD et HFD+Myriocine étaient de  $51,2 \pm 0,7$  g et de  $46,4 \pm 0,9$  g ( $P < 0,001$ ). De telles valeurs suggèrent donc que dans le cadre d'une condition de surcharge pondérale, la myriocine interfère avec la régulation du poids corporel.

### 3.2. Variation des valeurs de glycémie

---

Comme décrit précédemment, l'analyse de la glycémie mesurée dans les groupes STD, LFD et HFD a montré qu'un régime riche en graisses induit une augmentation de la concentration plasmatique en glucose ( $207,6 \pm 12,1$  mg/dl pour le groupe HFD *versus*  $108,8 \pm 5,8$  mg/dl pour le groupe STD,  $130,1 \pm 6,5$  mg/dl pour le groupe LFD ;  $P < 0,001$ ) (Figure 25B). Le traitement avec la myriocine ne modifie pas la glycémie en condition LFD. En effet, avec une valeur moyenne de  $124,2 \pm 11,7$  mg/dl, le groupe LFD+Myriocine présente une glycémie similaire à celles des animaux STD et LFD (NS). A l'inverse, chez les animaux obèses, l'injection de myriocine induit une réduction significative de la glycémie ( $151,8 \pm 7,7$  mg/dl pour le groupe HFD+Myriocine *versus*  $207,6 \pm 12,1$  mg/dl pour le groupe HFD ;  $P < 0,001$ ), atteignant des valeurs proches des valeurs mesurées dans les groupes STD et LFD. Ce résultat indique que dans le cadre d'un excès de masse pondérale, un traitement basé sur la myriocine améliore l'hyperglycémie en la réduisant.



**Figure 25.** Augmentation relative du poids corporel des souris au cours du protocole en fonction du régime alimentaire et du traitement ou non par injection de myriocine à la semaine 16 (A). Concentration sanguine en glucose au sein des différents groupes expérimentaux à la semaine 16 (B). STD, n=10 ; LFD, n=12 ; HFD, n=13 ; LFD+Myriocine, n=6 ; HFD+Myriocine, n=9. Les résultats sont exprimés en pourcent et correspondent aux moyennes  $\pm$  SEM. La signification statistique a été analysée par one-way ANOVA suivi d'un post test de Newman-Keuls. \*  $P \leq 0,05$  versus STD ; +  $P \leq 0,05$  HFD versus LFD ; #  $P \leq 0,05$  HFD+Myriocine versus HFD.

	STD (n=10)	LFD (n=12)	LFD + Myriocine (n=6)	HFD (n=13)	HFD + Myriocine (n=9)
<b>Poids du rein droit (mg/mm de longueur du tibia)</b>	15,1 ± 0,2	14,0 ± 0,6	14,0 ± 0,4	18,3 ± 0,3 *** +++	15,6 ± 0,2 ##
<b>Poids du foie (mg/mm de longueur du tibia)</b>	72,0 ± 0,4	66,4 ± 4,3	59,0 ± 5,7	115,6 ± 23,4 *** +++	76,5 ± 3,9 ###
<b>Poids du cœur (mg/mm de longueur du tibia)</b>	7,3 ± 0,2	6,6 ± 0,3	6,6 ± 0,0001	8,3 ± 0,1 ++	7,7 ± 0,3
<b>Quantité d'eau ingérée – (ml/24h)</b>	3,8 ± 0,4	3,3 ± 0,2	4,1 ± 0,3	3,1 ± 0,2	4,0 ± 0,1
<b>Quantité de nourriture ingérée – (g/24 h)</b>	7,2 ± 0,1	5,5 ± 0,2 ***	5,2 ± 0,1 ***	5,3 ± 0,2 ***	5,0 ± 0,1 # ***
<b>Concentration plasmatique en NEFA– (nM)</b>	1300 ± 115	1463 ± 135	2094 ± 298	2245 ± 201 *** +++	1684 ± 155
<b>Concentration plasmatique en adiponectine – (µg/ml)</b>	13,3 ± 1,5	15,9 ± 2,3	19,3 ± 3,1 *	10,0 ± 1,1	13,4 ± 1,2 ■ ■
<b>UACR – (µg/mg Cre)</b>	14,3 ± 1,2	11,8 ± 1,4	23,2 ± 2,5 * ● ●	23,3 ± 2,2 * +++	33,5 ± 3,6 *** ■ ##

**Tableau 3.** Récapitulatifs des divers paramètres métaboliques étudiés au sein des différents groupes expérimentaux à la semaine 16. Valeurs des poids moyens des reins, du foie et du cœur, valeurs de la quantité d'eau ingérée, de la quantité de nourriture ingérée, valeurs des concentrations plasmatiques en adiponectine et en acides gras non-estérifiés (NEFA), et enfin, valeur de l'excrétion urinaire en albumine. Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM. Les analyses statistiques ont été réalisées par un one-way ANOVA suivi d'un post test de Newman-Keuls. \*  $P \leq 0,05$  versus STD ; +  $P \leq 0,05$  HFD versus LFD ; #  $P \leq 0,05$  HFD+Myriocine versus HFD ; ●  $P \leq 0,05$  LFD+Myriocine versus LFD ; ■  $P \leq 0,05$  HFD+Myriocine versus LFD+Myriocine.

### **3.3. Variation du poids des organes**

---

Concernant le poids moyen des reins, nous constatons que le traitement avec de la myriocine n'induit aucune différence chez les souris recevant un régime faible en graisses (LFD+Myriocine) en comparaison avec les groupes STD et LFD. Alors que chez les souris HFD, pour lesquelles nous avons déjà souligné une augmentation du poids des reins, le traitement avec la myriocine permet de prévenir cette augmentation. Les souris du groupe HFD+Myriocine présentent donc des valeurs similaires aux souris STD, LFD ou encore LFD+Myriocine.

Nous constatons les mêmes observations en ce qui concerne le poids du foie. Ainsi, la myriocine permet de prévenir l'hypertrophie du foie observée chez les animaux HFD.

Les animaux HFD non traités sont caractérisés par une élévation significative du poids de leur cœur ( $P < 0,001$ ). Chez les animaux HFD+Myriocine, par contre, bien que le poids du cœur soit plus élevé que celui des LFD+Myriocine, il n'en est pas statistiquement différent, ce qui suggère une tendance à prévenir l'hypertrophie cardiaque chez les HFD+Myriocine.

### **3.4 Variation de la quantité d'eau et de nourriture ingérées**

---

La comparaison des valeurs de prise en eau et de nourriture, reprises au Tableau 3, indique qu'aucune différence statistiquement significative n'existe entre les différents groupes expérimentaux en ce qui concerne la quantité d'eau moyenne ingérée. Pour ce qui est de la quantité de nourriture, rappelons que le groupe STD a ingéré plus de nourriture que les autres groupes expérimentaux. Les animaux LFD et HFD, traités à la myriocine ne présentent pas de différence par rapport aux animaux LFD et HFD non traités.

### **3.5 Variation de la concentration plasmatique en acides gras non estérifiés (NEFA)**

---

Les concentrations plasmatiques en NEFA dans les conditions HFD et LFD ont été comparées entre les divers groupes expérimentaux (Tableau 3). Comme précédemment décrit dans la première partie du mémoire, les souris HFD sont caractérisées par une augmentation de leur concentration plasmatique moyenne en NEFA ( $P < 0,01$ ). Bien qu'aucune différence statistique n'ait été observée dans les concentrations plasmatiques en NEFA entre les animaux STD, LFD et LFD+Myriocine, il semble que le traitement induise une légère augmentation des NEFA plasmatiques. En condition HFD, le traitement tend à réduire la concentration en NEFA, mais à nouveau, aucune différence significative n'est observée entre le groupe HFD et le groupe HFD+L-NIL.

### **3.6 Variation de la concentration plasmatique en adiponectine**

---

La variation des concentrations plasmatiques en adiponectine est présentée dans le Tableau 3. Comme décrit précédemment, la comparaison des valeurs des divers groupes de souris montre que l'obésité induit une diminution de la concentration plasmatique en adiponectine, néanmoins, d'un point de vue statistique, il n'y a pas de différence significative entre le groupe HFD et les conditions contrôles LFD et STD. Quant aux résultats relatifs aux effets de la myriocine, les données montrent que les souris LFD traitées présentent une concentration sanguine supérieure aux souris STD ainsi qu'aux souris LFD. Cependant, les différences observées entre le groupe traité et les deux groupes non traités sont significatives

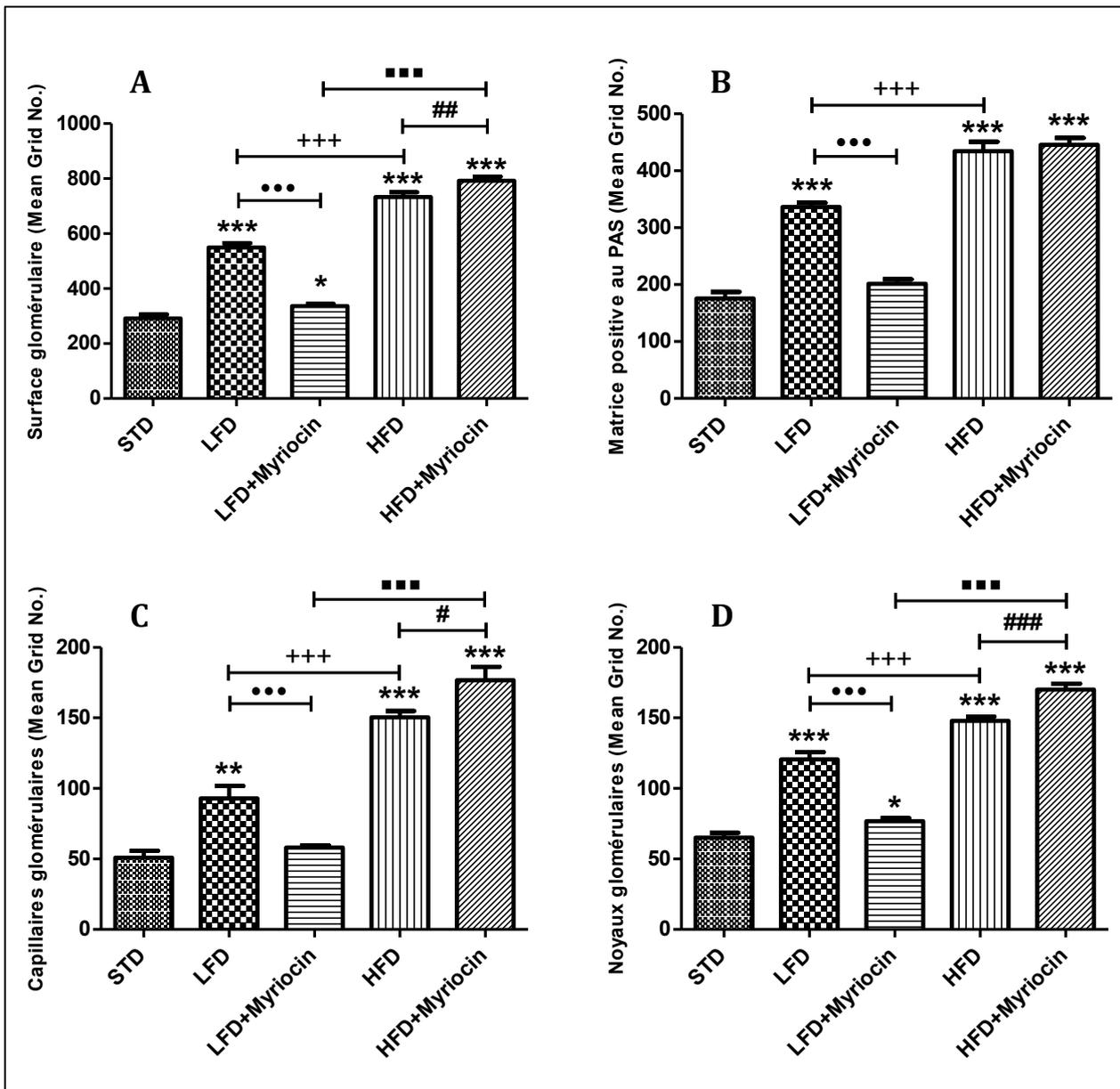
seulement en comparaison avec la condition STD ( $P < 0,05$ ). Ces résultats indiquent qu'en condition LFD, la myriocine aurait tendance à augmenter la concentration sanguine en adiponectine. En condition HFD, aucune différence significative n'est observée entre le groupe HFD non-traité et les animaux traités.

### **3.7 Variation de l'albuminurie**

La fonction rénale fut évaluée à la semaine 16 via le dosage de l'albumine dans les urines (Tableau 3). Les données obtenues à partir de ce dosage confirment les observations décrites précédemment, à savoir que les souris HFD présentent une albuminurie plus élevée que les valeurs mesurées chez les souris STD et LFD ( $P < 0,05$ ). Nous pouvons également observer que quelque soit la condition considérée, le traitement à l'aide de myriocine provoque une élévation de l'albuminurie. En effet les animaux LFD traités et HFD traités présentent une concentration urinaire en albumine significativement plus haute que les animaux LFD non traités et HFD non traités respectivement ( $P < 0,01$ ). De tels résultats suggère que la myriocine altère la fonction rénale résultant en une augmentation de l'albuminurie.

### **3.8 Évaluation de l'effet de la myriocine sur les atteintes glomérulaires**

Dans la première partie des résultats, le comptage semi-quantitatif des éléments du glomérule nous avait déjà révélé qu'un régime LFD et HFD induit une augmentation de la taille du glomérule, une extension de la matrice extracellulaire, une augmentation du nombre de noyaux et de la surface de filtration capillaire. Comme illustré à la figure 26, l'administration de myriocine fait varier ces paramètres à plusieurs niveaux. Premièrement, la myriocine diminue l'hypertrophie glomérulaire induite par le régime LFD ( $P < 0,001$ ) alors qu'en condition HFD, elle accentue de manière significative cette hypertrophie ( $P < 0,01$ ) (Figure 26A). Deuxièmement, de la même manière que pour l'hypertrophie glomérulaire, la myriocine prévient l'expansion mésangiale en condition LFD ( $P < 0,001$ ). Cependant, en condition HFD, elle n'induit aucune variation de ce paramètre (Figure 26B). En ce qui concerne la pôle vasculaire du glomérule, la myriocine diminue significativement la dilatation des vaisseaux chez les animaux LFD jusqu'à obtenir des valeurs similaires au groupe STD ( $P < 0,001$ ). Toutefois, lorsque les souris sont nourries avec un régime HFD, l'effet de la myriocine se traduit par une augmentation de surface de filtration glomérulaire ( $P < 0,05$ ) (Figure 26C). Finalement, nous pouvons observer que la myriocine diminue le nombre de noyaux en condition LFD ( $P < 0,001$ ) alors qu'en condition HFD elle l'augmente de manière significative ( $P < 0,001$ ) (Figure 26D). De tels résultats semblent indiquer que le traitement serait approprié dans la prévention des lésions glomérulaires induite par un régime riche en hydrates de carbone alors qu'il pourrait s'avérer inefficace si le régime est riche en graisse, comme c'est le cas dans notre étude.



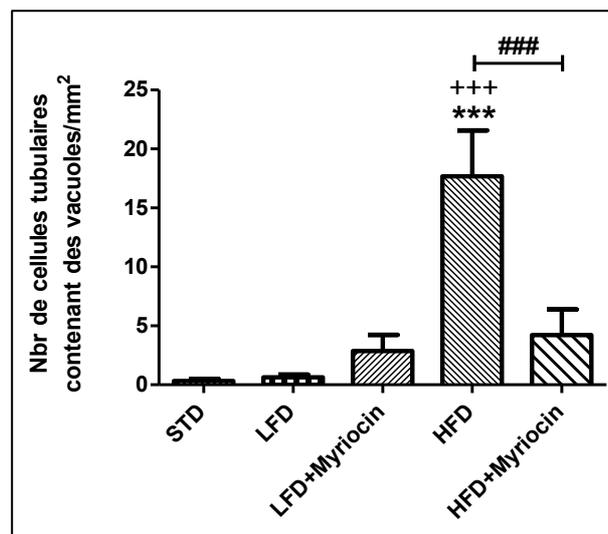
**Figure 26.** Analyse quantitative de la surface glomérulaire en fonction du régime et du traitement à la semaine 16. STD, n=10 ; LFD, n=12 ; LFD+Myriocine, n=6 ; HFD, n=13 ; HFD+Myriocine, n=9. L'analyse comprend l'évaluation de la surface glomérulaire (A) l'évaluation de la matrice mésangiale (B) l'évaluation de la surface de filtration capillaire (C) ainsi que l'évaluation du nombre de noyaux (D). Les résultats sont présentés en moyennes ± SEM. La signification statistique a été analysée par one-way ANOVA suivi d'un post test de Newman-Keuls. \*  $P \leq 0,05$  versus STD ; +  $P \leq 0,05$  versus LFD ; #  $P \leq 0,05$  HFD+Myriocine versus HFD ; •  $P \leq 0,05$  LFD+Myriocine versus LFD ; ■  $P \leq 0,05$  HFD+Myriocine

### 3.9 Évaluation de l'effet de la myriocine sur les atteintes tubulaires

La Planche 7 illustre les lésions tubulaires dans les reins des souris HFD et des souris LFD traitées par la myriocine. Comme décrit précédemment dans la première partie du mémoire « caractérisation de l'obésité », les coupes de reins obtenues à partir d'animaux HFD présentent un grand nombre de tubules proximaux vacuolisés et une bordure en brosse altérée. Ici, nous constatons que les lésions histologiques caractérisées par la présence de ces vacuoles dans les cellules tubulaires proximales en condition HFD sont réduites, lorsque les animaux

sont traités avec la myriocine. En effet, nous pouvons constater une nette réduction du nombre de vacuoles, et une perte de bordure en brosse moins importante chez les animaux traités en comparaison avec les animaux non traités (Flèche).

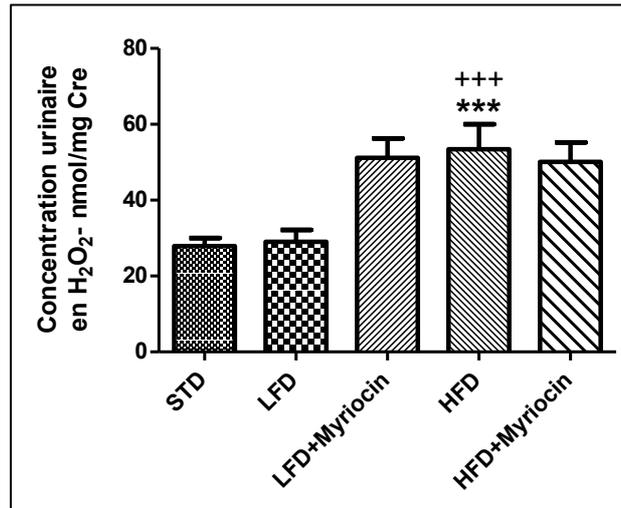
L'analyse semi-quantitative de ces atteintes tubulaires, illustrée dans la Figure 27, reflète que l'augmentation significative du nombre de vacuoles contenues dans les cellules tubulaires proximales en condition HFD est très nettement réduite, voire même abolie, en condition HFD+Myriocine. Ces résultats suggèrent que la myriocine prévient l'apparition de ces vacuoles liée à la condition d'obésité.



**Figure 27.** Analyse semi-quantitative du nombre de cellules tubulaires proximales contenant des vacuoles par mm<sup>2</sup> en fonction du régime et du traitement à la semaine 16. STD, n=10 ; LFD, n=12 ; LFD+Myriocine, n=6 ; HFD, n=13 ; HFD+Myriocine, n=9. Les résultats sont présentés en moyennes ± SEM. La signification statistique a été analysée par un one-way ANOVA suivi d'un post test de Newman-Keuls. \*  $P \leq 0,05$  versus STD ; +  $P \leq 0,05$  HFD versus LFD ; #  $P \leq 0,05$  HFD+Myriocine versus HFD.

### 3.10 Variation de l'excrétion urinaire en hydrogène peroxyde (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

La figure 28 illustre les changements de concentrations urinaires en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans chaque groupe (nmol/ mg de créatinine). Pour rappel, les souris nourries avec un régime HFD présentent une concentrations urinaire en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus élevée que celles des souris STD et LFD (53,4 ± 6,6 nmol/ mg de créatinine pour les animaux HFD *versus* 27,9 ± 2,2 nmol/ mg de créatinine et 29,0 ± 3,1 nmol/ mg de créatinine pour le groupe STD et LFD respectivement ;  $P < 0,01$ ). En condition LFD, le traitement à l'aide de myriocine induit une augmentation de cette concentration, néanmoins non significative (29,0 ± 3,1 nmol/ mg Cre pour les animaux LFD *versus* 51,2 ± 5,1 nmol/ mg de créatinine pour les animaux LFD+Myriocine ; NS). En condition HFD, le traitement n'induit pas de variations significatives (53,4 ± 6,6 nmol/ mg de créatinine pour les animaux HFD *versus* 50,1 ± 5,1 nmol/ mg de créatinine pour les animaux HFD+ Myriocine ; NS).



**Figure 28.** Evaluation des l'excrétion d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ mg Cre en fonction du régime et du traitement à la semaine 16. STD, n=9 ; LFD, n=12 ; LFD+Myriocine, n=6 ; HFD, n=13 ; HFD+Myriocine , n=9). Les résultats sont présentés en moyennes  $\pm$  SEM. La signification statistique a été analysée par one-way ANOVA suivi d'un post test de Newman-Keuls. \*  $P \leq 0,05$  versus STD ; +  $P \leq 0,05$  HFD versus LFD.

La prévalence de l'obésité dans le monde, plus particulièrement dans les pays occidentaux, a augmenté ces 20 dernières années d'une manière telle que la maladie a atteint le stade épidémique. Elle représente aujourd'hui un réel problème de santé publique et un fardeau économique pour les gouvernements devant prendre en charge les personnes en surcharge pondérale. Pour rappel, l'obésité est une maladie métabolique multifactorielle qui est généralement associée à un excès de tissu adipeux blanc. En conditions physiologiques, le tissu adipeux agit comme un organe endocrine capable de sécréter d'importantes hormones ainsi que des substances bioactives appelées adipokines telles que la leptine ou l'adiponectine. Dans l'obésité, ces adipokines sont libérées dans des proportions anormales (*Adamczak et al., 2013*). De plus, le tissu adipeux produit également des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , MCP-1 et l'IL-6. D'un point de vue plus global, ces anomalies de la production d'adipokines peuvent induire des perturbations métaboliques. La maladie est reconnue depuis longtemps comme un important facteur de risque dans l'apparition de nombreuses pathologies telles que le syndrome métabolique, le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires. Plus récemment, l'émergence croissante de nombreux problèmes rénaux nécessitant à long terme le recours à la dialyse ou encore des transplantations rénales chez des personnes atteintes de surpoids, a poussé les chercheurs à s'intéresser à l'impact de l'obésité sur la fonction rénale. Etant donné les nombreux problèmes cardiovasculaires, métaboliques et inflammatoires auxquels la pathologie est associée, l'intérêt dans la recherche et le développement de traitements visant à rétablir les altérations métaboliques induites par l'obésité s'est fortement développé ces dernières années. A cet égard, l'un des objectifs de ce mémoire était d'évaluer au niveau systémique et au niveau rénal, les effets bénéfiques potentiels de deux traitements. L'un d'eux cible le métabolisme du NO (L-N6-(1-Iminoethyl)lysine ou L-NIL) tandis que l'autre cible le métabolisme des sphingolipides (Myriocine). Dans cette optique, nos objectifs ont consisté à caractériser le modèle de l'obésité chez la souris de manière systémique, et ensuite, à évaluer les altérations fonctionnelles et histologiques induites par la pathologie dans le tissu rénal.

## **Partie 1. Caractérisation d'un modèle d'insuffisance rénale induite par un régime riche en graisses chez la souris C57Bl/6**

---

Dans la première partie du mémoire, nous avons mis en évidence qu'une alimentation riche en graisses (HFD) induit chez des souris C57Bl/6 une augmentation rapide et importante du poids corporel. Celle-ci correspond à une adiposité viscérale caractéristique d'un syndrome métabolique. De plus, une augmentation de la glycémie fut observée chez les souris HFD en comparaison aux souris LFD indiquant l'apparition d'une résistance à l'insuline et/ou d'une intolérance au glucose. Cependant, d'après le laboratoire Jackson les souris B6 DIO (Diet-Induced Obesity) développent une hyperglycémie modérée sans développer de diabète clinique (*The Jackson Laboratory-C57Bl/6J Diet-induced obesity (DIO) phenotype*). L'observation d'une concentration élevée en NEFA dans le sérum des souris HFD confirme l'apparition d'une dyslipidémie associée à l'obésité. Finalement, une hypoadiponectémie est apparue chez nos souris. Pour rappel, l'adiponectine est une adipokine connue pour être dérégulée dans l'obésité (*Arita et al., 1999*). Des résultats similaires furent observés dans des études précédentes utilisant des souris C57Bl/6 en surpoids (*Boini et al., 2010; Bullen et al., 2007; Declèves et al., 2011; Deji et al., 2009; Jiang et al., 2005; Podrini et al., 2013, Tsuchiya*) mais aussi chez des rats rendus obèses par un régime HFD (*Cao et al., 2012*), confirmant ainsi la validité de notre modèle.

Les souris C57Bl/6 développant une obésité sous régime HFD est un modèle particulièrement approprié pour identifier les anomalies systémiques et rénales car elle

n'implique pas de modifications génétiques ni de chirurgie invasive. De plus, les souris C57BL/6 ont été décrites comme étant susceptibles de développer une résistance à l'insuline et une intolérance au glucose par rapport à d'autres souches telles que des souris A/J ou C3H/He connues pour être plus résistantes à l'obésité (*West et al., 1992*). L'augmentation de la concentration plasmatique des acides gras et de la glycémie observée chez les souris HFD traduit l'apparition de désordres métaboliques. Il fut démontré que des concentrations plasmatiques en NEFA élevées peuvent induire des effets lipotoxiques néfastes entraînant le développement d'une résistance à l'insuline (*Grundy, 2004*). L'hyperglycémie que nous avons pu mettre en évidence peut résulter d'un défaut dans la production et dans l'utilisation de l'insuline ce qui suggère que dans notre étude, les souris HFD développent une résistance à l'insuline. Notons cependant que certaines études ont suggéré que chez la souche C57BL/6 nourrie avec un régime HFD, le développement d'une hyperglycémie serait plutôt la conséquence d'une intolérance au glucose que d'une résistance à l'insuline (*Rossmesl et al., 2003*). L'intolérance au glucose est également appelée pré-diabète puisqu'elle augmente considérablement le risque de développer un diabète ainsi que des maladies cardiovasculaires. Elle est caractérisée par une concentration sanguine élevée en glucose et faible en insuline. Dans ce cas, les souris sont incapables de métaboliser correctement le glucose de par les altérations du tissu adipeux, un organe endocrine jouant un rôle important dans la régulation de l'homéostasie du glucose. La concentration plasmatique en insuline devrait être mesurée dans notre modèle afin de pouvoir confirmer ces hypothèses.

Les souris HFD sont quant à elles caractérisées par une concentration plasmatique faible en adiponectine, une adipokine normalement libérée en grande quantité dans le sang et aux propriétés anti-inflammatoires. Il existe une association inverse entre la production en adiponectine et le développement de l'obésité (*Kershaw and Flier, 2004*). Cette diminution serait liée à l'hypoxie du tissu adipeux résultant de l'adiposité viscérale (*Ye et al., 2007*). En effet, il a été montré que la diminution de la sécrétion d'adiponectine apparaissait avant le développement de l'obésité et de la résistance à l'insuline (*Hotta et al., 2001*). Par ailleurs, il est possible que l'augmentation de la concentration plasmatique en NEFA ainsi que l'hyperglycémie observés chez les souris HFD soit le résultat d'une intolérance au glucose et d'une augmentation de la résistance à l'insuline déclenchés par les faibles niveaux en adiponectine, comme cela fut prouvé précédemment chez des souris déficientes pour cette adipokine (*Kubota et al., 2002 ; Maeda et al., 2002*).

Chez des patients ainsi que dans des modèles expérimentaux de surcharge pondérale (*Gröne et al., 1989; Deji et al., 2009; Goumenos et al., 2009; Declèves et al., 2011; Li et al., 2011*), les lésions rénales associées à l'obésité sont caractérisées par une protéinurie, une hypertrophie glomérulaire et une glomérulosclérose. Concernant la fonction rénale, nous avons évalué la concentration urinaire en albumine chez nos souris. Cette protéine chargée négativement et de haut poids moléculaire n'est normalement pas présente dans les urines. Cependant, si la perméabilité de la membrane glomérulaire vient à être modifiée suite à diverses altérations métaboliques, l'albumine peut franchir la barrière de filtration et se retrouver dans la lumière tubulaire. Par conséquent, une augmentation de l'albuminurie est le signe d'un déclin de la fonction rénale (*Sharma et al., 2009*). Les données relatives à notre protocole expérimental ont révélé une augmentation significative de l'albuminurie chez les souris HFD indiquant une perte de la fonction rénale. Les maladies métaboliques telles que l'obésité sont associées avec une augmentation de la microalbuminurie chez des patients atteints d'insuffisance rénale, ainsi que dans les modèles animaux (*Zhao et al., 2006; Goumenos et al., 2009; Declèves et al., 2011 ; Jiang et al., 2005*). La littérature évoque plusieurs origines à l'apparition d'une albuminurie. Elle serait due à un dysfonctionnement des podocytes liée à une hypoadiponectémie, à une augmentation de la synthèse de facteurs vasoactifs tels que l'angiotensine II. Elle pourrait aussi avoir lieu sous l'effet de l'action de l'insuline ou de la

leptine (*Chagnac et al., 2013 ; Sharma, 2009*). Elle peut également être due à une altération du glycocalix de l'endothélium entraînant une augmentation de la perméabilité de la membrane basale du glomérule (*Salmon et al., 2012*). Enfin, des changements hémodynamiques conduisant à une hypertrophie glomérulaire et une hyperfiltration peuvent également augmenter l'albuminurie.

Comme mentionné précédemment, l'obésité induit l'accumulation de lipides dans le tissu adipeux, mais aussi dans les tissus non-adipeux, et peut déterminer une lipotoxicité constituant un facteur clé dans le dysfonctionnement cellulaire induit par un régime HFD. Au vu des résultats obtenus pour le poids des reins, du foie et du cœur, nous pouvons établir que les souris HFD ont développé une hypertrophie de ces organes, qui s'accompagne d'une forte augmentation de la masse du tissu adipeux chez ces souris, comme déjà rapporté dans d'autres études (*Bobulescu et al., 2008 ; Kosha et al., 2008 ; Ussher et al., 2012 ; Yang et al., 2009*). Dans ces conditions, la capacité du tissu adipeux à stocker les graisses n'est plus suffisante pour gérer l'apport calorique dû à un régime HFD. Par conséquent, une grande quantité d'acides gras est délivrée dans la circulation, d'où l'importante concentration en NEFA mesurée. Ces lipides vont se déposer dans des sites ectopiques provoquant l'hypertrophie des organes. L'hypertrophie du cœur peut provenir d'une altération de la capacité du cœur à oxyder les acides gras entraînant ainsi l'accumulation des métabolites des acides gras au sein du tissu myocardique (Diacylglycerol, Triacylglycérol, céramides) (*Ussher et al., 2012*). L'hypertrophie du tissu hépatique, quant à elle, peut être due à une stéatose hépatique subséquente à l'obésité, avec une accumulation importante de triglycérides, l'une des formes de lipides les plus stockés dans le foie (*Yang et al., 2009*). Les analyses histologiques réalisées sur le rein ont également révélé une hypertrophie rénale, ainsi que des dommages glomérulaires tels qu'une glomérulosclérose apparente, une augmentation globale de l'espace glomérulaire, un épaississement de la membrane basale du glomérule, une dilatation de la capsule de Bowman, une altération des vaisseaux capillaires se manifestant par une dilatation capillaire. L'augmentation de la taille du glomérule est généralement associée à une activation des cellules mésangiales. Par ailleurs, notre modèle est également caractérisé par une expansion de la matrice mésangiale. Ces cellules constituent un support important pour les capillaires glomérulaires et possèdent une activité contractile. Des cellules mésangiales hyperactives produisent une quantité de matrice extracellulaire excessive en réponse à différentes stimulations telles qu'une élévation de la concentration sanguine de glucose, ou encore à une stimulation par le TGF- $\beta$  et le MCP-1. Il n'est pas exclu que l'augmentation de la concentration en acides gras dans le sang puisse jouer un rôle dans l'activation des cellules mésangiales de manière similaire à l'effet du glucose. La matrice mésangiale extracellulaire produite par les cellules mésangiales est constituée de fibronectine, de collagène de type I et IV, de glycosaminoglycans sulfatés et de laminine (*Lee, 2011*). Le TGF- $\beta$  est un facteur clé dans la régulation de la production et de la composition de la matrice extracellulaire et peut être exprimé par les cellules mésangiales ainsi que par les podocytes. Il fut démontré qu'en présence d'une forte concentration de glucose, des cellules mésangiales mises en culture produisent du collagène et du TGF- $\beta$  (*Sharma and Ziyadesh, 1994*). La MCP-1 est également une importante chemokine produite par les cellules mésangiales. Une augmentation de l'expression de la MCP-1 est généralement associée à une progression de la néphropathie diabétique puisqu'elle est sur-réglée chez les patients diabétiques présentant des altérations rénales (*Tashiro et al., 2002*). La chemokine est également surexprimée en présence d'une forte concentration en glucose (*Ha et al., 2002*). Une fois activée, elle induit la production de fibronectine et de collagène I et IV par les cellules mésangiales (*Giunti et al., 2008 ; Park et al., 2008*). Notre modèle présente donc bien des altérations glomérulaires similaires à celles observées dans des conditions expérimentales semblables (*Boini et al., 2010 ; Declèves et al., 2011 ; Jiang et al., 2005 ; Prabhakar et al., 2007 ; Ruggiera et al., 2011*). Malgré cette

constatation, il faut bien noter que les souris nourries par un régime LFD présentent également certaines altérations, bien que la taille de leurs glomérules soit significativement plus faible que celles des souris HFD. En effet, les analyses histologiques montrent que les souris LFD présentent des capillaires dilatés et une expansion de la matrice mésangiale. Il n'est donc pas exclu que le régime LFD, bien qu'il soit considéré comme un contrôle, puisse être à l'origine d'altérations glomérulaires de par sa richesse en hydrates de carbone (70%). En effet, lorsque ces données sont comparées aux résultats obtenus chez les souris STD, nous pouvons observer que les glomérules des souris STD présentent significativement moins de lésions que les souris LFD.

Les analyses histologiques réalisées sur les autres zones du rein de souris HFD ont montré la présence d'une quantité importante de vacuoles au sein des cellules des tubules proximaux, significativement plus élevée que chez les souris LFD et STD. L'immunomarquage de la NEP a permis de démontrer que ces vacuoles se situent principalement au niveau des segments S1 et S2 des tubules proximaux. La marquage de l'aquaporine-1, quant à lui, a permis de mettre en exergue que la présence de ces vacuoles induit des dommages cellulaires aux cellules tubulaires se traduisant par une perte de la bordure en brosse des ces tubules, qui est considérée comme un signe de lésion tubulaire. En effet, les tubules proximaux seraient particulièrement sensibles étant donné leur rôle dans la réabsorption d'acides gras (*Gekle, 2005*). Selon les travaux de Maunsback et al. (1996), les segments S1 et S2 présentent des caractéristiques spécifiques les rendant vulnérable à l'apparition de vacuoles lipidiques. En effet, le segment S1 possède un système d'endocytose plus important. Le segment S2, quant à lui, présente un plus grand nombre de lysosomes ; à l'inverse du segment S3 qui présente un réseau d'endocytose plus faible et un plus petit nombre de mitochondries. Cette vacuolisation est le reflet d'une altération tubulaire, de changements tubulaires dégénératifs et d'une atrophie (*Li et al., 2011*). A ce stade, l'origine précise de l'apparition de ces vacuoles n'est pas encore élucidée et la composition exacte de leur contenu n'est pas connue. Cependant, ce phénomène de vacuolisation fut précédemment observé chez des cochons atteints de syndrome métabolique (*Li et al., 2011*), chez des rats Zucker obèses (*Bobulescu et al., 2008 ; Li et al., 2005*) ainsi que chez des souris obèses suivant un régime HFD (*Kiss et al., 2013 ; Ma et al., 2011*). Par ailleurs, le rein ne serait pas le seul organe à présenter ce type de vacuolisation. En effet, dans le foie, des macro- et des micro- vacuoles ont été reportées chez des souris HFD. Selon Li et al (2011), ces vacuoles proviendraient d'une accumulation lipidique. Par ailleurs, selon l'étude réalisée par Jiang et al (2005), cette accumulation de lipides serait due à une altération du métabolisme lipidique intrarénal et serait déclenchée par une surexpression de « sterol regulatory element-binding proteins 1 et 2 », des régulateurs du métabolisme du cholestérol et des acides gras. D'après les mêmes auteurs, ces lipides seraient composés de triglycérides et de cholestérol. D'autres études ont suggéré que cette accumulation de lipides dans le rein suivant un régime HFD serait déclenchée suite à un déséquilibre entre les activités respectives de lipogenèse et de lipolyse rénales. Les enzymes lipogéniques seraient surexprimées tandis que l'activité des enzymes de la lipolyse serait supprimée (*Kume et al., 2007*).

Les maladies rénales associées à l'obésité sont également caractérisées par une inflammation rénale modérée. Dans cette étude, nous avons pu observer une augmentation de la concentration urinaire en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) chez les souris HFD. L' $H_2O_2$  est généralement utilisé comme un marqueur du stress oxydatif et de l'inflammation. Par conséquent, les données obtenues suggèrent une inflammation et du stress oxydatif au sein du tissu rénal. De précédentes études ont également observé une élévation de l'excrétion urinaire de  $H_2O_2$ , confirmant nos résultats (*Declèves et al., 2011 ; Prabhakar et al., 2007 ; Ruggiero et al., 2011*). A ce sujet, une association entre le stress oxydatif et l'apparition de vacuoles pourrait être envisagée. En effet, une étude réalisée sur des souris hyperglycémiques et hyperlipidémiques a suggéré que la présence de gouttelettes lipidiques au sein du tissu rénal

induirait une augmentation de marqueurs de stress oxydatif tels que la xanthine oxydoréductase et la nitrotyrosine (Kiss *et al.*, 2013). De la même manière, une autre étude réalisée dans des conditions similaires a mis en évidence une augmentation de la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les mitochondries, reflétant une altération de la balance redox, et suggérant que le stress oxydatif apparent serait dû à une surcharge lipidique. Ces événements conduiraient ainsi le rein à développer un mécanisme adaptatif afin de maintenir l'activité de la chaîne de respiration normale (Ruggiero *et al.*, 2011). Cette élévation de l'excrétion urinaire en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut avoir plusieurs origines : une concentration élevée en acides gras et une diminution de la concentration en HDL (Kiss *et al.*, 2013), une activation des cellules mésangiales qui en réponse à l'hyperglycémie vont produire l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Shah *et al.*, 2007); l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut être également produit par la NADPH oxydase activée par le TNF- $\alpha$ , une adipokine produite en quantité importante dans l'obésité (Kiss *et al.*, 2013) ; la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> serait le résultat d'une diminution de la production de l'adiponectine connue pour atténuer la production d'espèces réactive oxygénées (ERO) induite par une forte concentration en glucose ou en LDL oxydés (Kershaw and Flier, 2004). Ce stress oxydatif peut être à l'origine des altérations rénales observées (Shah *et al.*, 2007).

L'un des résultats majeurs obtenu dans cette étude est la diminution de l'excrétion des nitrites/nitrates chez les souris HFD. Ce résultat suggère que l'altération du métabolisme du NO participe à la progression des maladies rénales associées à l'obésité. De précédentes études sur le NO ont également décrits une diminution de l'excrétion des nitrites/nitrates dans un modèle de rat obèse (Dobrian *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2005; Prabhakar *et al.*, 2007). Cette diminution fut associée au dysfonctionnement endothélial et à certaines altérations rénales telles que la glomérulosclérose et les dommages tubulo-interstitiels (Goligorsky *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2005).

Le NO est produit par les NOSs et joue un rôle important dans la physiologie rénale (Baylis, 2008). Par conséquent, une altération de la production de NO pourrait participer au développement de néphropathies. La diminution de l'excrétion des nitrites/nitrates observée chez les souris HFD peut avoir plusieurs origines. Elle peut notamment être due à une déficience en NOSs se traduisant par une diminution de la synthèse de NO, hypothèse sur laquelle nous reviendrons dans la deuxième partie de la discussion des résultats. Deuxièmement, elle peut provenir d'une diminution de la biodisponibilité en NO suivant divers altérations métaboliques associées à l'obésité. Celle-ci peut apparaître suite au concentrations élevés en acides gras libre connus pour altérer la production de NO dans des artères (Zhang *et al.*, 2011). Une augmentation du stress oxydatif peut également engendrer un diminution de la concentration en NO et donc diminuer sa biodisponibilité (Kiss *et al.*, 2013). Un phénomène appelé « découplage de la eNOS » pourrait également expliquer la diminution de la biodisponibilité en NO. Ce processus se manifeste dans des conditions particulières où l'enzyme produit du superoxide (l'O<sub>2</sub><sup>•</sup>) et de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au lieu du NO. Cet O<sub>2</sub><sup>•</sup> peut par après réagir avec le NO pour produire du peroxynitrite (ONOO<sup>•</sup>) (Avogaro and Vigili de Kreutzenberg, 2005 ; Hang, 2009). L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ainsi que le glucose peuvent être à l'origine de l'apparition du phénomène de découplage de la eNOS (Kiss *et al.*, 2013).

La diminution de la production de NO dans les maladies rénales peut entraîner une élévation de la pression intraglomérulaire responsable des altérations glomérulaires observées dans les maladies rénales chroniques associées à l'obésité. Une déficience en NO est associée au dysfonctionnement endothélial et contribue à l'hypertension et aux complications microvasculaires observées dans des modèles de diabète (Forstermann and Munzel, 2006; Baylis, 2007). Par ailleurs, l'augmentation de la perméabilité de la barrière glomérulaire à l'origine de l'apparition de la microalbuminurie peut être induite par le dysfonctionnement endothélial, déterminé par la biodisponibilité en NO (Sun *et al.*, 2013).

En résumé, les résultats obtenus dans cette première partie démontrent bien que les souris nourries sous un régime HFD développent des anomalies physiopathologiques et rénales similaires à celles observées dans un syndrome métabolique.

## **Partie 2. Effets du L-NIL sur le métabolisme du NO dans un modèle d'insuffisance rénale induite par l'obésité**

---

Etant donné qu'une déficience en eNOS fut mentionnée à plusieurs reprises dans la littérature traitant de néphropathies diabétiques, nous avons étudié les potentiels effets bénéfiques d'un traitement interférant avec le métabolisme du NO : le L-NIL, un inhibiteur spécifique de la iNOS, l'une des trois enzymes produisant du NO. Mais contrairement à celui produit par la eNOS, ce NO a des propriétés cytotoxiques et pro-inflammatoires pouvant accélérer la progression des maladies rénales liées à l'obésité. Par ailleurs, beaucoup d'études ont mis en avant les effets néfastes d'une production excessive de NO par la iNOS (*Beckman And Koppenol, 1996*). De plus, contrairement à la eNOS, des études ont démontré une augmentation des niveaux protéiques en iNOS chez des rats obèses (*Cao et al., 2012*). Par conséquent, en limitant l'activité de la iNOS via l'administration de L-NIL, les effets attendus étaient une amélioration des différents marqueurs d'altérations rénales et systémiques.

L'analyse des paramètres métaboliques de base a premièrement montré que le traitement diminue de manière significative le poids des souris HFD sans faire varier celui des souris LFD. Les mêmes résultats ont été observés dans une étude réalisée sur des souris traitées avec du L-NAME, un inhibiteur des NOS (*Tsuchiya et al., 2007*). Deuxièmement, nous avons observé que ce traitement tend à diminuer la glycémie des souris HFD. Bien que ce dernier résultat soit non significatif, des études réalisées chez des souris HFD où le gène codant pour la iNOS a été délété ont montré une amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline de ces souris (*Perreault and Marette, 2001*). Dans une autre étude, ayant également utilisé du L-NIL, le traitement a diminué l'hyperglycémie de souris *ob/ob* de manière significative (*Fujimoto et al., 2005*).

Par la suite, nous avons démontré que le traitement n'affecte pas de manière significative ni le poids du cœur, ni celui du rein et ne permet donc pas de prévenir l'hypertrophie des organes associée à l'obésité. Inversement, nous avons pu observer une augmentation significative du poids du foie chez les animaux HFD traités mais pas chez les animaux LFD. Le traitement accentue donc l'hypertrophie du tissu hépatique en condition HFD. La cause de ce phénomène est inconnue. Cependant, les auteurs d'une précédente étude réalisée sur des souris déficientes pour la iNOS ont observé une accumulation excessive de lipides au niveau hépatique après une hépatectomie (*Rai et al., 1998*). L'inhibition de la iNOS perturberait donc le métabolisme et les fonctionnalités du foie.

Dans notre étude, l'inhibition de la iNOS n'induit pas de variation du stress oxydatif, ni de l'albuminurie alors que chez des rats soumis à une ischémie rénale induisant un contexte pro-inflammatoire, l'inhibition de la iNOS diminue la production de peroxy-nitrite et améliore les fonctions rénales (*Chatterjee et al., 2002*).

Suite aux analyses immunohistochimiques effectuées sur les reins des souris, nous avons pu observer qu'en condition LFD, la iNOS est exprimée au niveau des bordures en brosse des tubules proximaux tandis que la eNOS est exprimée au niveau des artères et de la bordure en brosse des tubules proximaux situés dans l'OSOM. En condition HFD, le régime induit une perte du marquage de la eNOS dans l'OSOM mais n'altère pas celui de la iNOS. Ces résultats ne coïncident pas avec ceux obtenus dans une situation pro-inflammatoire telle qu'une ischémie/reperfusion où la eNOS est exprimée au niveau de la médullaire interne, mais aussi au niveau des tubules collecteurs et des glomérules, en plus des cellules endothéliales (*Cowley et*

*al.*, 2003). Néanmoins, d'autres études confirment les observations relatives à la localisation de la iNOS (Mazroa *et al.*, 2009).

Alors que l'obésité altère l'expression de la eNOS de manière significative, les résultats provenant des qRT-PCR montrent que le régime HFD n'induit pas de variation dans les niveaux d'expression de la eNOS. Une étude réalisée sur des rats diabétiques montre également une diminution de l'activité de la eNOS mais une préservation des niveaux d'expression de la eNOS (Schwartz *et al.*, 2001). Nous pouvons mettre en parallèle ces résultats avec ceux obtenus pour l'excrétion en Nitrites et Nitrates chez les souris HFD. Comme décrit précédemment, cette diminution de l'activité de la eNOS, et donc de la production de NO, peut être due à une déficience de la NOS ou à une diminution de la disponibilité en substrat et/ou en cofacteurs essentiels impliqués dans la synthèse de NO. En effet, une dérégulation marquée de la eNOS fut observée dans une étude précédente réalisée chez des rats Zucker obèses (Li *et al.*, 2006). Une diminution des niveaux protéiques de la eNOS dans le tissu rénal de rats nourris avec une nourriture HFD fut également démontrée (Cao *et al.*, 2012). De plus, l'inhibition des NOSs entraîne des lésions rénales histologiques similaires à celles observées dans des maladies rénales chroniques telles que la glomerulosclérose et l'albuminurie (Baylis, 2007, Li *et al.*, 2005). Par conséquent, une déficience en eNOSs peut participer à la progression des maladies rénales. Cette dérégulation ou altération de l'eNOS peut provenir d'une altération de la phosphorylation de la ser 1179, qui en temps normal augmente l'activité de l'enzyme (Hang, 2009). Par exemple, il a été prouvé qu'une concentration élevée en glucose altère la dimérisation de l'enzyme ainsi que sa phosphorylation (Cheng *et al.*, 2012). Par ailleurs, il a été montré que la résistance à l'insuline diminue l'activité de la AKT kinase, une des enzyme phosphorylant la eNOS (Cheng *et al.*, 2012). La diminution de la production de l'adiponectine, une adipokine stimulant également la phosphorylation de la eNOS dans les cellules endothéliales, peut également être à l'origine d'une diminution de son activité (Van de Voorde *et al.*, 2013). En résumé, les résultats observés dans notre étude sont probablement dus à une altération de l'activité de la eNOS suite aux changements métaboliques provoqués par l'obésité. Notons que l'agent pharmacologique utilisé dans cette partie ne restaure pas l'expression de la eNOS au sein du tissu rénal. Ce résultat suggère qu'il n'y pas d'interférences entre les activités des deux NOS.

Chez les animaux traités avec du L-NIL, une réduction significative de l'expression au niveau protéique de l'enzyme iNOS dans le tissu rénal chez les souris LFD et principalement les HFD. Cette inhibition de la iNOS est accompagnée d'une diminution de l'expression génique de l'enzyme. Néanmoins, cette diminution est non significative. Ces données suggèrent que le traitement n'affecte pas seulement l'activité de l'enzyme mais peut également interférer avec la régulation de l'expression de la iNOS comme cela a déjà été démontré auparavant (Jurgen *et al.*, 2005). Il semblerait que le NO ait un effet autorégulateur sur l'expression de la iNOS (Kleinert *et al.*, 2003). Par ailleurs, une étude a montré la participation du NO dans une boucle de feedback positive stimulant l'expression de la iNOS au niveau des cellules mésangiales (Pfeilchifter *et al.*, 2001). Ces auteurs ont également montré que le L-NIL accentuait les altérations rénales (Theuer *et al.*, 2005). Dans notre étude, nous avons pu démontrer que l'inhibition de la iNOS améliore les fonctions tubulaires via une atténuation du phénomène de vacuolisation des cellules tubulaires proximales. Une des explications possibles serait que le L-NIL réduise le stress oxydatif ainsi que l'inflammation, améliorant ainsi l'environnement cellulaire des tubules et le rendant plus propice au bon fonctionnement des cellules. Par ailleurs il fut démontré que chez des souris HFD, une augmentation de l'expression de la iNOS contribue à l'apparition d'un stress oxydatif au niveau cellulaire (Ruggiero *et al.*, 2011). Par contre, d'après nos données, le L-NIL ne semble pas avoir d'effets sur les altérations glomérulaires, ni sur l'albuminurie.

Par conséquent, bien que des effets systémiques bénéfiques du L-NIL aient pu être mis en évidence dans notre modèle HFD, peu d'effets majeurs ont été démontrés quant à la fonction rénale.

### **Partie 3. Étude de l'effet de la myriocine, dans un modèle d'insuffisance rénale induite par l'obésité**

---

Depuis la mise en évidence d'une implication significative des sphingolipides dans les altérations métaboliques liées à l'obésité, nous avons évalué leur rôle dans la progression des maladies rénales liées à l'obésité. A cette fin, nous avons testé l'impact d'un traitement ciblant le métabolisme des sphingolipides sur différents paramètres affectés par l'obésité, à savoir la myriocine. Pour rappel, la myriocine est un inhibiteur de la palmytoyltransférase, la première enzyme de la voie de synthèse de novo du céramide. Le céramide est le précurseur lipidique de la synthèse de tous les sphingolipides. De récents travaux ont démontré que le métabolisme des sphingolipides serait fortement perturbé dans l'obésité suite à l'inflammation chronique associée à la pathologie. Ces lipides ont été identifiés comme des substances bioactives susceptibles d'induire une lipotoxicité dans les tissus où ils s'accumulent et d'augmenter ainsi le risque de développer des dysfonctionnements métaboliques multiples (*Kang et al., 2013*). Nos données montrent qu'une inhibition de la synthèse *de novo* du céramide induit une diminution significative de la masse corporelle et prévient donc l'excès pondéral induit par une nourriture HFD. Le traitement diminue également l'hypertrophie des organes associée à l'obésité, traduisant une réduction de l'accumulation lipidique dans les tissus ectopiques. En effet, le rein, mais aussi le foie et le cœur des souris HFD traitées, présentent un poids significativement inférieur à celui des souris HFD non traitées. D'après les données obtenues, ces observations ne résultent pas d'une diminution de la prise de nourriture et suggèrent dès lors que l'inhibition de la synthèse de céramide stimule le métabolisme et favorise la consommation d'énergie et d'oxygène, comme cela a été postulé dans des études précédentes (*Ussher et al., 2010, Yang et al., 2009*). Il a également été démontré que la myriocine prévient le dépôt de Diacylglycerol, dans les cellules myocardiques de souris obèses et qu'elle améliorerait également la glycolyse myocardique, d'où la réduction du poids du cœur observée dans notre étude (*Ussher et al., 2012*). Au niveau hépatique, ce traitement diminuerait la quantité de céramide dans le foie, l'accumulation de graisse macrovésiculaire et de triglycérides et réduirait la stéatose hépatique induite par l'obésité (*Yang et al., 2009 ; Zhang et al 2012*).

Du point de vue de la glycémie, nous avons démontré que la myriocine la diminue de manière significative. Sur base de l'obtention de résultats similaires, il a été postulé que ce traitement améliore la tolérance au glucose et réduit la résistance à l'insuline (*Ussher et al., 2010 ; Yang et al., 2009 ; Zhang et al., 2012*). La myriocine améliore donc l'utilisation du glucose par le métabolisme.

Concernant les concentrations plasmatiques en NEFA, nos données suggèrent que la myriocine tend à réduire la concentration plasmatique en NEFA. Sans toutefois que les résultats ne présentent une signification statistique, certaines études ont montré que chez des souris hyperlipidémiques, la myriocine diminue la concentration plasmatique en triglycérides, en cholestérols, en VLDL-cholestérol, en céramide et en sphingolipides, prouvant que la myriocine a la capacité de modifier le profil lipidique du plasma (*Park et al., 2008*).

Au niveau rénal, la myriocine prévient l'hypertrophie rénale et l'accumulation de lipides au sein des tubules proximaux. En effet, nous avons observé une nette réduction de la présence de vacuoles dans les cellules tubulaires, suggérant un gain fonctionnel des tubules proximaux. Ces observations suggèrent donc que les vacuoles lipidiques retrouvées dans les tissus rénaux

des souris HFD contiennent entre autres des sphingolipides. Cependant, au niveau des glomérules, alors que le traitement réduit les lésions associées au régime LFD, en condition HFD, il semblerait que la myriocine accentue l'expansion mésangiale ainsi que l'hypertrophie glomérulaire, associées à l'obésité. De plus, ces souris présentent une albuminurie plus élevée que les souris contrôles, aussi bien chez les souris HFD que chez les souris LFD. Pour rappel, une albuminurie élevée reflète un déclin des fonctions rénales. Ce résultat suggère donc que le traitement présente une certaine toxicité pour le rein qui se traduit en une élévation de l'albuminurie. Par ailleurs, cette observation ne peut être attribuée à une augmentation du stress oxydatif puisque celui-ci tend à diminuer chez les souris traitées. Le mécanisme cellulaire à l'origine de cette toxicité n'est pas encore connu.

En conclusion, nous avons pu reproduire au sein de notre laboratoire le phénotype du syndrome métabolique, avec des souris obèses présentant une hypertrophie multiple des organes, une hyperglycémie et des concentrations plasmatiques élevées en NEFA et ce, uniquement par exposition à un régime alimentaire riche en graisses. Il ressort de nos analyses que l'obésité induit une perte des fonctions rénales et un stress oxydatif reflétés par une augmentation de l'excrétion de l'albumine et de l' $H_2O_2$ . Les altérations morphologiques multiples du rein induites par l'obésité comprennent une glomérusclérose apparente, une hypertrophie glomérulaire, une expansion mésangiale, et un épaississement de la membrane glomérulaire. De plus, la présence de vacuoles lipidiques dans les cellules tubulaires et la perte de leur bordure en brosse sont le signe de perturbations des fonctions tubulaires. Ces altérations rénales sont associées à une diminution de l'excrétion de  $NO_x$ , résultant vraisemblablement d'une diminution de l'activité de la eNOS. Les souris C57Bl/6 représentent donc un modèle particulièrement intéressant à explorer tant en conditions physiologiques qu'en conditions physiopathologiques. Le traitement basé sur l'administration orale de L-NIL réduit considérablement le poids corporel et l'expression de la iNOS dans le rein, mais aussi l'hyperglycémie, l'activité de la eNOS et le nombre de vacuoles présentes dans les cellules tubulaires des souris obèses. La myriocine, quant à elle, interfère avec le métabolisme des sphingolipides pour diminuer le poids corporel des souris, l'hyperglycémie, et prévient l'hypertrophie du rein, du foie et du cœur. Au niveau rénal, le traitement améliore la morphologie tubulaire mais augmente l'albuminurie des souris. Au vu de ces résultats, ces deux agents pharmacologiques nécessitent d'autres études afin de bien déterminer leurs effets sur les différents organes cibles ainsi que leur intérêt thérapeutique potentiel.

Plusieurs perspectives pourraient être envisagées afin d'approfondir cette étude. Après une caractérisation des effets de l'obésité sur le rein, d'autres organes tels que le foie, le cœur et le tissu adipeux pourraient être également étudiés en vue de définir au niveau histologique les effets néfastes d'une nourriture HFD. Par exemple, nous pourrions tenter d'identifier la présence de vacuoles similaires à celles observées dans le rein dans d'autres organes. Plusieurs techniques pourraient également être mises au point afin de mieux caractériser le contenu de ces vacuoles. Par exemple, le marquage spécifique Oil red O pourrait être utilisé pour mettre en évidence les lipides neutres. Les phospholipides et le cholestérol pourraient être visualisés par Nile Red dye sur des coupes à froids. Il serait également intéressant de déterminer si les anomalies systémiques et rénales observées en condition HFD, s'améliorent lorsque les souris sont à nouveau alimentées par un régime LFD ou STD.

- Adamczak, M., & Wiecek, A. (2013). The adipose tissue as an endocrine organ. *Seminars in nephrology*, 33(1), 2-13.
- Albrecht, E.W., Stegeman, C.A., Tiebosch, A.T., Tegzess, A.M., & Van Goor, H. (2002). Expression of inducible and endothelial nitric oxide synthases, formation of peroxynitrite and reactive oxygen species in human chronic renal transplant failure. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 2(5), 448-53.
- Aljada, A., Ghanim, H., Assian, E., & Dandona P. (2002). Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits insulin-induced increase in endothelial nitric oxide synthase and reduces insulin receptor content and phosphorylation in human aortic endothelial cell. *Metabolism*, 51, 487-491.
- Amann, K., & Benz, K. (2013). Structural renal changes in obesity and diabetes. *Seminars in nephrology*, 33(1), 23-33.
- Anderson, P.W., Zhang, X.Y., Tian, J., Correale, J.D., Xi, X.P., Yang, D., Graf, K., et al. (1996) Insulin and angiotensin II are additive in stimulating TGF- $\beta$  1 and matrix mRNAs in mesangial cells. *Kidney International*, 50, 745-753.
- Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., Hotta, K., Shimomura, I., Nakamura, T., Miyaoka, K., Kuriyama, H., Nishida, M., Yamashita, S., Okubo, K., Matsubara, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 257, 79 – 83.
- Avogaro, A., & De Kreutzenberg, S. V. (2005). Mechanisms of endothelial dysfunction in obesity. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 360(1-2), 9-26.
- Bachmann, S., Bosse, H.M., & Mundel, P. (1995). Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthase in mammalian kidney. *American Journal of Physiology, Renal Physiology*, 268, 885-898.
- Baylis, C. (2008). Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 294(1), 1-9.
- Beckman, J. S., & Koppenol, W. H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly. *American Journal of Physiology*. 271, 1424-1437.
- Beilby J. (2004). Definitions of Metabolic Syndrome : Report of the National Heart, Lung and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. *Circulation*, 109, 433-438.
- Bianco, S., Bonet, J., López, D., Casas, I., & Romero, R. (2005). ACE inhibitors improve nephrin expression in Zucker rats with glomerulosclerosis. *Kidney International*, 93, 10-14.

- Bobulescu, I. A., Dubree, M., Zhang, J., Mcleroy, P., & Moe, O. W. (2008). Effect of renal lipid accumulation on proximal tubule Na<sup>2</sup> / H<sup>2</sup> exchange and ammonium secretion. *The American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 8856, 1315–1322.
- Boini, K. M., Zhang, C., Xia, M., Poklis, J. L., & Li, P. (2010). Role of Sphingolipid Mediator Ceramide in Obesity and Renal Injury in Mice Fed a High-Fat Diet □. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 334, 839 – 846.
- Bouloumie, A., Marumo, T., Lafontan, M., & Busse, R. (1999) Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *The FASEB Journal*, 13(10), 1231-1238.
- Brenner, B.M., Garcia, D.L., & Anderson S. (1988). Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *American Journal of Hypertension*, 1, 335-347.
- Brenner, B. M., Lawler, E. V, & Mackenzie, H. S. (1996). The hyperfiltration theory: a paradigm shift in nephrology. *Kidney International*, 49(6), 1774–1777.
- Bruce, K. D., & Byrne, C. D. (2009). The metabolic syndrome: common origins of a multifactorial disorder. *Postgraduate Medical Journal*, 85(1009), 614–21.
- Bryan, N.S., Calvert, J.W., EGundewar, S., & Lefer, D.J. (2008). Dietary nitrite restores NO homeostasis and is cardioprotective in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Free Radical Biology & Medicine*, 45, 468-474.
- Bullen, J. W., Bluher, S., Kelesidis, T., & Mantzoros, C. S. (2007). Regulation of adiponectin and its receptors in response to development of diet-induced obesity in mice, *American Journal of Physioogyl Endocrinooogy and Metabolism*, 292, 1079–1086.
- Bullo, M., Garcia-Lorda, P., Megias, I., & Salas-Salvado, J. (2003). Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obesity Research*, 11(4), 525-31.
- Bursill, C.A., Channon, K.M., & Greaves, D.R. (2004). The role of chemo-kines in atherosclerosis: recent evidence from experimental models and population genetics. *Current Opinion in Lipidology*, 15(2), 145-149.
- Cao, J., Inoue, K., Sodhi, K., Puri, N., Peterson, S. J., Rezzani, R., & Abraham, N. G. (2012). High-fat diet exacerbates renal dysfunction in SHR: reversal by induction of HO-1-adiponectin axis. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 20(5), 945–53.
- Chagnac, A., Weinstein, T., Korzets, A., Ramadan, E., Hirsch, J., et al. (2013). Glomerular hemodynamics in severe obesity. *American Journal of Physiology – Renal Physiology*, 278, 817-822.
- Chatterjee, P.K., Patel, N.S., Kvale, E.O., Cuzzocrea, S., Brown, P.A., Stewart, K.N., Mota-Filipe, H., & Thiernemann, C. (2002). Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney International*, 61(3), 862-671

- Cheng, H., Wang, H., Fan, X., Paueksakon, P., & Harris, R. C. (2012). Improvement of endothelial nitric oxide synthase activity retards the progression of diabetic nephropathy in db/db mice. *Kidney International*, 82(11), 1176-1183.
- Chou, D.E, Cai, D., Jayadevappa & J.G Porush. (2001). Regional expression of inducible nitric oxide synthase in the kidney stimulated by lipopolysaccharide in the rat. *Experimental Physiology*, 87(2), 153-162.
- Chudek, J., Adamczak, M., Nieszporek, T., & Wiecek, A. (2006). The Adipose Tissue as an Endocrine Organ – A Nephrologists' Perspective, *Contributions to Nephrology* 151, 70-90.
- Cignarelli, M., & Lamacchia, O. (2007). Obesity and kidney disease. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases : NMCD*, 17(10), 757-762.
- Cowley, M.A., Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdán, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., et al., (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, 411, 480-484.
- Cowley, A. W., Mori, T., Mattson, D., Zou, A., Jr, A. W., Mori, T., & Mattson, D. (2003). Role of renal NO production in the regulation of medullary blood flow of renal function. *The American Journal Physiology Regul Integr Comp Physiol*, 285, 1355 – 1369.
- Declèves, A.-E., Mathew, A. V, Cunard, R., & Sharma, K. (2011). AMPK mediates the initiation of kidney disease induced by a high-fat diet. *Journal of the American Society of Nephrology* , 22(10), 1846-1855.
- Deji, N., Kume, S., Araki, S., Soumura, M., Sugimoto, T., Isshiki, K., Chin-Kanasaki, M., Sakaguchi, M., Koya, D., Haneda, M., Kashiwagi, A., & Uzu, T. (2009) Structural and functional changes in the kidneys of high-fat diet-induced obese mice. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 296(1), 118-126.
- De Zeeuw, D., Parving, H. & Henning, R.H. (2006). Microalbuminuria as an early marker for cardiovascular disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17, 2100-2105.
- Dobrian, A., Davies, M., Schriver, S., Lauterio, J., & Russel, L. (2001). Oxidative Stress in a Rat Model of Obesity-Induced hypertension. *Hypertension*, 37, 554–560.
- Eknoyan, G. (2006). A history of obesity, or how what was good became ugly and then bad. *Advance in Chronic Kidney Disease*, 13, 421-7.
- Eknoyan, G. (2011). Obesity and chronic kidney disease. *Nefrología : publicación oficial de la Sociedad Española Nefrología*, 31(4), 397-403.
- Erdely, A., Freshour, G., Maddox, D.A., Olson, J.L., Samsell, L., & Baylis, C. (2004). Renal disease in rats with Type 2 diabetes is associated with decreased renal nitric oxide production. *Diabetologie*, 47(10), 1672-1676.

- Flegal, K.M., Carroll, M.D., Ogden, C.L., & Johnson, C.L. (2002). Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999–2000. *Journal of the American Medical Association*, 288, 1723–1727.
- Flegal, K. M., Carroll, M. D., Ogden, C. L., & Curtin, L. R. (2010). Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999–2008. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 303(3), 235–41.
- Förstermann, U., & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*, 33(7), 829–37, 837a–837d.
- Frangioudakis, G., Garrard, J., Raddatz, K., Nadler, J.L., Mitchell, T.W., & Schmitz-Peiffer, C. (2010). Saturated and n-6 polyunsaturated fat diets each induce ceramide accumulation in mouse skeletal muscle: reversal and improvement of glucose tolerance by lipid metabolism inhibitors. *Endocrinology*, 21.
- Fujimoto, M., Shimizu, N., Kunii, K., Martyn, J. A. J., Ueki, K., & Kaneki, M. (2005). A Role for iNOS in Fasting Hyperglycemia and Impaired Insulin Signaling in the Liver of Obese Diabetic Mice. *Diabetes*, 54, 1340 – 1348.
- Fujita, T., Inoue, K., Yamamoto, S., Ikumoto, T., Sasaki, S., Toyama, R., et al. (1994). Fungal metabolites. Part 11. A potent immunosuppressive activity found in Isaria sinclairii metabolite. *The Journal of Antibiotics*, 47, 208–215.
- Gekle, M. Renal tubule albumin transport. (2005). *Physiology – Annual Review of Physiology*, 67, 573–594.
- Giunti, S., Tesch, G. H., Pinach, S., Burt, D. J., Cooper, M. E., Cavallo-Perin, P., Camussi, G., et al. (2008). Monocyte chemoattractant protein-1 has pro-sclerotic effects both in a mouse model of experimental diabetes and in vitro in human mesangial cells. *Diabetologia*. 51(1), 198–207.
- Goligorsky, M.S., Chen, J., & Brodsky, S. (2009). *Endothelial Cell Dysfunction Leading to Diabetic Nephropathy Focus on Nitric Oxide*. 37(2), 744–748.
- Gonzalez, E., Gutierrez, E., Morales, E., Hernandez, E., Andres, A., & Bello, I. (2005). Factors influencing the progression of renal damage in patients with unilateral renal agenesis and remnant kidney. *Kidney International*, 68, 263–267.
- Goumenos, D. S., Kavar, B., El Nahas, M., Conti, S., Wagner, B., Spyropoulos, C., Vlachojannis, J. G., et al. (2009). Early histological changes in the kidney of people with morbid obesity. *Nephrology, Dialysis, Transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 24(12), 3732–3738.
- Griffin, K. A., Kramer, H., & Bidani, A. K. (2013). Adverse renal consequences of obesity. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 294, 685–696.
- Gröne, H.J., Walli, A., Gröne, E., Niedmann, P., Thiery, J., Seidel, D., & Helmchen, U. (1989). Induction of glomerulosclerosis by dietary lipids. A functional and morphologic study in

- the rat. *Laboratory Investigation*, 60, 433-446.
- Grundy, S. M. (2004). Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(6), 2595–600.
- Guyton A and Hall J. *Medical Physiology*. Saunders Elsevier 1 vol: 11<sup>th</sup> ed., 2005.
- Ha, H., Yu, M. R., Choi, Y. J., Kitamura, M., & Lee, H. B. (2002). Role of high glucose-induced nuclear factor-kappaB activation in monocyte chemoattractant protein-1 expression by mesangial cells. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 13(4), 894–902.
- Hall, J.E. (2003). The kidney, hypertension and obesity. *Hypertension*, 41, 625-633.
- Hanada, K., Hara, T., Nishijima, M., Kuge, O., Dickson, R.C., & Nagiec, M.M. (1997). A mammalian homolog of the yeast LCB1 encodes a component of serine palmitoyltransferase, the enzyme catalysing the first step in sphingolipid synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 32108-32114.
- Hannun, Y.A., & Obeid, L.M. (2002). The ceramide-centric universe of lipid mediated cell regulation : stress encounters of the lipid kind. *Journal of Biochemical Chemistry*, 277, 25847-25850.
- Heilbronn, L., Smith, S.R., & Ravussin, E. (2004) Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus. *International Journal of Obesity*, 28, 12–21.
- Heimbürger, O., Lonnqvist, F., Danielsson, A., Nordenstrom, J., & Stenvinkel, P. (1997). Serum immunoreactive leptin concentration and its relation to the body fat content in chronic renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology*, 8, 1423-1430.
- Helal, I., Fick-Brosnahan G.M., Reed-Gitomer, B., & Schrier, R.W. (2012). Glomerular hyperfiltration: definitions, mechanisms and clinical implications. *Nature reviews Nephrology*, 8(5), 293-300.
- Hikaru K and Ichikawa L. Progression of Chronic Renal Diseases: International Symposium, International Symposium, Vol. 118, 1996.
- Hostetter, T.H., Olson, J.L., Rennke, H.G., Venkatachalam, M.A., & Brenner, B.M. (1981). Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *American journal of Physiology*, 241, 85-93.
- Hotta, K., Funahashi, T., Bodkin, N. L., Ortmeyer, H. K., Arita, Y., Hansen, B. C., & Matsuzawa, Y. (2001). Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes*, 50(5), 1126–33.
- Huang, P.L. (2009). A comprehensive definitions for metabolic syndrome. *Disease models & Mechanisms*, 2, 231-237.

- Ingelfinger, J. R. (2003). Is microanatomy destiny. *New England Journal of Medicine*, 348(2), 99-100.
- Iseki, K., Ikenuya, Y., Kinjo, K., Inoue, T., Iseki, C., & Takishita, S. (2004). Body mass index and the risk of development of end-stage renal disease in a screened cohort. *Kidney International*, 65(5), 1870-1876.
- Jiang, T., Wang, Z., Proctor, G., Moskowitz, S., Liebman, S. E., Rogers, T., Lucia, M. S., et al. (2005). Diet-induced obesity in C57BL/6J mice causes increased renal lipid accumulation and glomerulosclerosis via a sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(37), 32317–32325.
- Kalaitzidis, R. G., & Siamopoulos, K. C. (2011). The role of obesity in kidney disease: recent findings and potential mechanisms. *International Urology and Nephrology*, 43(3), 771-84.
- Kambham, N., Markowitz, G. S., Valeri, a M., Lin, J., & D'Agati, V. D. (2001). Obesity-related glomerulopathy: an emerging epidemic. *Kidney international*, 59(4), 1498-509.
- Kang, S., Kim, B., Lee, S., & Park, T. (2013). Sphingolipid metabolism and obesity-induced inflammation. *Frontiers in Endocrinology*, 4, 1–11.
- Kawar, B., Bello, AK., & El Nahas, AM. (2009). High prevalence of microalbuminuria in the overweight and obese population: data from a UK population screening programme. *Nephron Clinical Practice*, 112, 205–212.
- Kato, S., Luyckx, V.A., Ots, M., Lee, K.W., Ziai, F., Troy, J.L., Brenner, B.M., & MacKenzie, H.S. (1999). Renin-angiotensin blockade lowers MCP-1 expression in diabetic rats. *Kidney International*, 56, 1037–1048.
- Kershaw, E., & Flier S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(6), 2548-2556.
- Kim, K.H, Song, M.J., Chung, J., Park, H., & Kim, JB. (2005) Hypoxia inhibits adipocyte differentiation in a HDAC-independant manner. *Biochemic al and Biophysical Research Communiation*, 333(4), 1178-1184.
- Kiss, E., Kränzlin, B., Wagenblab, K., Bonrouhi, M., Thiery, J., Gröne, E., Nordström, V., et al. (2013). Lipid droplet accumulation is associated with an increase in hyperglycemia-induced renal damage prevention by Liver X Receptors. *The American Journal of Pathology*, 182(3), 727-741.
- Klahr, S. (2001). The role of nitric oxide in hypertension and renal disease progression. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 16 (1), 60–2.
- Kleinert, H., Schwarz, P.M., Förstermann, U. (2003). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biological Chemistry*, 384, 1343– 1364.

- Koide, S. & Ichikawa, L. (1995). Progression of chronic renal disease : International Symposium, Shizuoka. Vol 118.
- Koska, J., Stefan, N., Permana, P. A., Weyer, C., Sonoda, M., Bogardus, C., & Smith, S. R. (2008). Increased fat accumulation in liver may link insulin resistance with subcutaneous abdominal adipocyte enlargement , visceral adiposity, and hypoadiponectinemia in obese individuals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87, 295–302.
- Koya, D., Hayashi, K., Kitada, M., Kashiwagi, A., Kikkawa, R., & Haneda, M. (2003). Effects of antioxidants in diabetes-induced oxidative stress in the glomeruli of diabetic rats *Journal of the American Society of Nephrology*, 53, 250-253.
- Kri, W., & Elgar, M. Renal anatomy. In: *Johnson R, Feedbally J*, eds. *Comprehensive Clinical Nephrology*, 2<sup>nd</sup> ed., 2003, Edinburgh.
- Kubota, N., Terauchi, Y., Yamauchi, T., Kubota, T., Moroi, M., Matsui, J., Eto, K., Yamashita, T., Kamon, J., Satoh, H., Yano, W., Froguel, P., Nagai, R., Kimura, S., Kadowaki, T., Noda, T. (2002). Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 25863–25866.
- Kume, S., Uzu, T., Araki, S., Sugimoto, T., & Isshiki, K. (2007). Role of Altered Renal Lipid Metabolism in the Development of Renal Injury Induced by a High-Fat Diet. *Basic Research*, 18, 2715–2723.
- Laville, M. (2011). Renal consequences of obesity. *Néphrologie & thérapeutique*, 7(2), 80–5.
- Lee, H. S. (2011). Role of TGF- $\beta$  in Mesangial Matrix Accumulation in Chronic Progressive Glomerular Disease. *An Update on Glomerulopathies – Etiology and Pathogenesis*, 123-140.
- Lehninger, A.L. (2008). *Principles of Biochemistry*, 5<sup>th</sup> edition.
- Lee, H. S. (2011). Role of TGF- $\beta$  in Mesangial Matrix Accumulation in Chronic Progressive Glomerular Disease. *An Update on Glomerulopathies – Etiology and Pathogenesis*, 123-140.
- Lewis R. *Understanding Chronic Kidney Disease: A Guide for the Non-specialist*, 2012.
- Li, Z., Rodriguez, B., Ni, Z., Shahkarami, A., Sepassi, L., Vaziri, N.D. (2005). Effect of hereditary obesity on renal expressions of NO synthase , caveolin-1 , AKt , guanylate cyclase , and calmodulin. *Kidney international*, 68, 2766–2772.
- Li, Z., Woollard, J. R., Wang, S., Korsmo, M. J., Ebrahimi, B., Grande, J. P., Textor, S. C., et al. (2011). Increased glomerular filtration rate in early metabolic syndrome is associated with renal adiposity and microvascular proliferation. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 301(5), 1078–1087.
- Ma, L., Corsa, B. A., Zhou, J., Yang, H., Li, H., Tang, Y., Babaev, V. R., et al. (2011). Angiotensin type 1 receptor modulates macrophage polarization and renal injury in obesity

- Angiotensin type 1 receptor modulates macrophage polarization and renal injury in obesity. *American Journal of physiology. Renal physiology*, 300, 1203–1213.
- Maeda, N., Shimomura, I., Kishida, K., Nishizawa, H., Matsuda, M., Nagaretani, H., Furuyama, N., Kondo, H., Takahashi, M., Arita, Y., Komuro, R., Ouchi, N., Kihara, S., Tochino, Y., Okutomi, K., Horie, M., Takeda, S., Aoyama, T., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. (2002). Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nature Medicine*, 8, 731–737.
- Manson, J.E., Colditz, G.A., Stampfer, M.J., et al. (1990). A prospective study of obesity and risk of coronary heart disease in woman. *New England Journal of Medicine*, 322, 882–883.
- Martin, S.S., Qasim, A., & Reilly, M.P. (2008). Leptin resistance—a possible interface of inflammation and metabolism in obesity-related cardiovascular disease. *Journal of American College of Cardiology*, 52, 1201–10.
- Matsuzawa, Y. (2006). The metabolic syndrome and adipocytokines. *Expert Review of Clinical Immunology*, 3(1), 39–46.
- Maunsbach, A.B. (1996). The influence of different fixatives and fixation methods on the ultrastructure of rat kidney proximal tubule cells. I. Comparison of different perfusion fixation methods and of glutaraldehyde, formaldehyde and osmium tetroxide fixatives. *Journal of ultrastructure research*, 15(3), 242–282.
- Mazroa, S. A., Asker, S. A., & El-shafey, S. (2009). Immunohistochemical Distribution of Inducible Nitric Oxide Synthase Enzyme ( iNOS ) in the Renal Cortex of Control and Diabetic Adult Male Albino Rats and the Effect of iNOS Inhibition by Aminoguanidine. *Egyptian Journal of Histology*, 32(1), 235–245.
- Meier-Kriesche, H.U., Arndorfer, J.A., Kaplan, B. (2002) The impact of body mass index on renal transplant outcomes : a significant independent risk factor for graft failure and patient death. *Transplantation*, 73, 70–74.
- Merril, A.H. (2002). De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *Journal of Biochemical Chemistry*, 277, 25843–25846.
- Misra, A., & Khurana, L. (2008). Obesity and the Metabolic Syndrome in Developing Countries, *The Journal of Endocrinology and Metabolism*, 93, 9–30.
- Mount, P.F., & Power, P.A. (2006). Nitric oxide in the kidney: function and regulation of synthesis. *Acta physiology*, 187, 433–446.
- Nakagawa, T., Sato, W., Glushakova, O., Heinig, M., Clarke, T., Campbell-Thompson, M., Yuzawa, Y., et al. (2007). Diabetic endothelial nitric oxide synthase knockout mice develop advanced diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(2), 539–50.
- Navar, L.G., E.W. Inscho, D.S.A Majid, J.D. Imig, L.M. Harrison-Bernard, & K.D. Mitchell. Paracrine régulation of the renal microcirculation. *Physiology review*, 75, 425–436, 1996.

- Ninomiya, T., Perkovic, V., Galan, B. E. De, Zoungas, S., Pillai, A., Jardine, M., Patel, A., et al. (2009). Albuminuria and Kidney Function Independently Predict Cardiovascular and Renal Outcomes in Diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(8), 1813–1821.
- Nitta, K. (2011). Possible link between metabolic syndrome and chronic kidney disease in the development of cardiovascular disease. *Cardiology Research and Practice*, 963517, 1-7.
- Nordfors, L., Lonnqvist, F., Heimbürger, O., Danielson, A., Schalling, M., & Stenvinkel, P. (1998). Low leptin gene expression and hyperleptinémie in chronic renal failure. *Kidney International*, 54, 1267-1275.
- Pai, R., Kirschenbaum, M.A. & Kamanna, (1995).V.S. Low-density lipoprotein stimulates the expression of macrophage colony-stimulating factor in glomerular mesangial cells. *Kidney International*, 48, 1254-1262.
- Park, T.S., Rosebury, W., Kindt, E.K., Kowala, M.C., & Panek, R.L. (2008). Serine palmitoyltransferase inhibitor myricoin induces the regression of atherogenic plaques in hyperlipidemic ApoE-deficient mice.
- Park, J., Ryu, D.-R., Li, J. J., Jung, D.-S., Kwak, S.-J., Lee, S. H., Yoo, T.-H., et al. (2008). MCP- 1/CCR2 system is involved in high glucose-induced fibronectin and type IV collagen expression in cultured mesangial cells. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 295(3), 749–757.
- Paz, Y., Frolkis, I., Pevni, D., Shapira, I., Yuhás, Y., Laina, A., Wollman., et al. (2003). Effect of tumor necrosis factor-alpha on endothelial and inducible nitric oxide synthase messenger ribonucleic acid expression and nitric oxide synthesis in ischemic and non ischemic isolated rat heart. *Journal of the American College of Cardiology*, 42(7), 1299–1305.
- Perreault, M., & Marette, A. (2001). Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nature Medecine*, 7(10), 1138-1143.
- Pfeilschifter, J., Eberhardt, W., Beck K.F. (2001) Regulation of gene expression by nitric oxide. *Pflügers Arch-Euopeanr Journal of Physiology*, 442. 479-486,
- Pi-Sunyer, X. (2009). The medical risks of obesity. *Postgraduate Medical Journal*, 121, 21-33.
- Podrini, C., Cambridge, E. L., Lelliott, C. J., Carragher, D. M., Estabel, J., Gerdin, A.-K., Karp, N. a, et al. (2013). High-fat feeding rapidly induces obesity and lipid derangements in C57BL/6N mice. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*, 69–75.
- Prabhakar, S., Starnes, J., Shi, S., Lonis, B., & Tran, R. (2007). Diabetic Nephropathy Is Associated with Oxidative Stress and Decreased Renal Nitric Oxide Production. *Basic Research*, 18, 2945–2952.
- Reaven, G.M. (1988). Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37(12), 1595-1607.

- Rocchini, A.P., Key, J., Bondie, D., Chico, R., Moorehead, C., Katch V, et al. (1989). The effect of weight loss on the sensitivity of blood pressure to sodium in obese adolescents. *New England Journal of Medicine*, 321, 580-585.
- Roh, D.D., Kamanna, V.S., & Kirschenbaum, M.A. (1998). Oxidative modification of low-density lipoprotein enhances mesangial cell protein synthesis and gene expression of extracellular matrix proteins. *American Journal of Nephrology*. 18, 344-350.
- Rossmeisl, M., Rim, J. S., Koza, R. a, & Kozak, L. P. (2003). Variation in type 2 diabetes--related traits in mouse strains susceptible to diet-induced obesity. *Diabetes*, 52(8), 1958–1966.
- Rovin, B.H., & Tan, L.C. (1993). LDL stimulates mesangial fibronectin production and chemoattractant expression. *Kidney International*, 43, 218-225.
- Ruan X and Guan Y. (2009). Metabolic syndrome and chronic kidney disease. *Journal of Diabetes*, 1, 236-245.
- Rudra, M.R., Fung Yee J. Lee, Rosen, A., Shi Qi Yang, Hui Zhi Lin, Koteish, A., Foo Y. Liew, Zaragoza, C., Lowenstein, C., A. A. M. D. (1998). Impaired liver regeneration in inducible nitric oxide synthase-. *The National Academy of Sciences*, 95, 13829–13834.
- Ruggenenti, P., Fassi, A., Llieva, A.P, Bruno, S., Live, I.P., Brusegan, V., Rubis, N., et al. (2004). Preventing mircoalbuminuria in type 2 diabetes. *New England Journal of Medicine*, 351, 1941-1295.
- Ruggiero, C., Ehrenshaft, M., Cleland, E., & Stadler, K. (2011). High-fat diet induces an initial adaptation of mitochondrial bioenergetics in the kidney despite evident oxidative stress and mitochondrial ROS production. *American Journal of Endocrinology and Metabolism*, 300, 1047–1058.
- Rüster, C., & Wolf, G. (2013). The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in obesity-related renal diseases. *Seminars in Nephrology*, 33(1), 44–53.
- Salmon, A. H. J., Ferguson, J. K., Burford, J. L., Gevorgyan, H., Nakano, D., Harper, S. J., Bates, D. O., et al. (2012). Loss of the endothelial glycocalyx links albuminuria and vascular dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 23(8), 1339–50.
- Sartipy, P., & Loskutoff, D.J. (2003). Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proceeding of the National Academy of Science*, 100(12), 7265-7270.
- Schimt-Peiffer, C. (2010). Targeting Ceramide Synthesis to Reverse Insulin Resistance. *Diabetes*, 59, 2351-2353.
- Serra, A., Romero, R., Lopez, D., Navarro, M., Esteve, A., Perez, N., Alastrue, A., et al. (2008). Renal injury in the extremely obese patients with normal renal function. *Kidney International*, 73(8), 947–55.
- Shah, S. V., Baliga, R., Rajapurkar, M., & Fonseca, V. A. (2007). Oxidants in Chronic Kidney

- Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 10, 16–28.
- Sharma, K. (2009). The link between obesity and albuminuria: adiponectin and podocyte dysfunction. *International Society of Nephrology*, 72(2), 145-148.
- Sharma, K., & Ziyadesh, F.N. (1995). Role of transforming growth factor-beta in diabetic glomerulosclerosis and renal hypertrophy. *Kidney International, Supplement*, 51, S34-S36.
- Schwartz, D., Schwartz, I.F., and Blantz, R.C. (2001). An analysis of renal nitric oxide contribution to hyperfiltration in diabetic rats. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 137(2), 107–114.
- Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C., & Hauner, H. (2007). Relationship between adipocyte size and adipokine expression and excretion. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(3), 1023-1033.
- Silverthorn Dee Unglaub, *Physiologie humaine 4ème edition*, Pearson education, 2007
- Singh, P., & Thomson, SC. (2010). Renal homeostasis and tubuloglomerular feedback. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 19(1), 59-64.
- Slee, A. D. (2012). Exploring metabolic dysfunction in chronic kidney disease. *Nutrition & Metabolism*, 9(1), 36.
- Stokes, Y., Dugas, R., Tang, Y., Garg, H., Guidry, E., & Bryan, N.S. (2009). Dietary nitrite prevents hypercholesterolemic microvascular inflammation and reverse endothelial dysfunction. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 296, 1281-1288.
- Sun, X., Yu, Y., & Han, L. (2013). High FFA levels related to microalbuminuria and uncoupling of VEGF-NO axis in obese rats. *International Urology and Nephrology*, 37, 1197-1207.
- Surwit, R. S., Kuhn, C. M., Cochrane, C., McCubbin, J. A., & Feinglos, M. N. (1988). Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes*, 37, 1163-1167.
- Tang, S., Leung, J.C.K., Abe, K., Chan, K.W., Chan, L.Y.Y., Chan, T.M., & Lai, K.L. (2003). Albumin stimulates interleukin-8 expression in proximal tubular epithelial cells in vitro and in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, 111, 515-527
- Tao, L., Gao, E.H., Jiao, X.Y., Yuan, Y., Christopher, T.A., Lopez, B.L., Koch, et al. (2007). Adiponectin cardioprotection after myocardial ischemia/reperfusion involves the reduction of oxidative/nitrative stress. *Circulation*, 115, 1408 – 1416.
- Terada, Y., Tomita, K., Nonoguchi, H., & Marumo, F. (1992). Polymerase chain reaction localization of constitutive nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase messenger RNAs in microdissected rat nephron segments. *Journal of Clinical Investigation*, 90, 1448-1460.

- Theuer, J., Shagdarsuren, E., Muller, D.N., Kaergel, E., Honeck, H., Park, J.K., Fiebeler, A., Dechend, R., Haller, H., Luft, F.C. & Schunck, W.H. (2005). Inducible NOS inhibition, eicosapentaenoic acid supplementation, and angiotensin II – induced renal damage. *Kidney international*, 67, 248–258.
- Tsuchiya, K., Sakai, H., Suzuki, N., Iwashima, F., Yoshimoto, T., Shichiri, M., & Hirata, Y. (2007). Chronic blockade of nitric oxide synthesis reduces adiposity and improves insulin resistance in high fat-induced obese mice. *Endocrinology*, 148(10), 4548–56.
- Tashiro, K., Koyanagi, I., Saitoh, A., Shimizu, A., Shike, T., Ishiguro, C., Koizumi, M., Funabiki, K., Horikoshi, S., Shirato, I., Tomino, Y. (2002). Urinary levels of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and interleukin-8 (IL-8), and renal injuries in patients with type 2 diabetic nephropathy. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16(1), 1-4.
- Ussher, J. R., Folmes, C. D. L., Keung, W., Fillmore, N., Jaswal, J. S., Cadete, V. J., Beker, D. L., et al. (2012). Inhibition of Serine Palmitoyl Transferase I Reduces Cardiac Ceramide Levels and Increases Glycolysis Rates following Diet-Induced Insulin Resistance. *Plos One*, 7(5), 1 – 12.
- Ussher, J. R., Koves, T. R., Cadete, V. J. J., Zhang, L., Jaswal, J. S., Swyrd, S. J., Lopaschuk, D. G., et al. (2010). Inhibition of De Novo Ceramide Synthesis Reverses Diet-Induced Insulin Resistance and Enhances Whole-Body Oxygen Consumption. *Diabetes*, 59(October), 2453–2464.
- US Renal Data System USRDS. (2005). Annual Data Report. Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States. Bethesda, MD: National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health.
- Van de Voorde J. Pauwels B, Boydens C, & Decaluwé K. (2013). Adipocytokines in relation to cardiovascular disease. *Metabolism Clinical and Experimental*, 13, 1-9.
- Van Harmelen, V., Ariapart, P., Hoffstedt, J., Lundkvist, I., Bringman, S., & Arner P. (2002). Increased adipose angiotensinogen gene expression in human obesity. *Obesity Research*, 8, 337-341.
- Wang, Y., Chen, X., Song, Y., Caballero, B., & Cheskin, L. J. (2008). Association between obesity and kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Kidney International*, 73(1), 19-33.
- West, D.B., Boozer, C.N., Moody, D.L., & Atkinson, R.L. (1992). Dietary obesity in nine inbred mouse strains. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 262, 1025-1032.
- Wever, R., Boer, P., Hijmering, M., Stroes, E., Verhaar, M., Kastelein, J., Versluis, K., Lagerwerf, F., et al. (1999). Nitric oxide production is reduced in patients with chronic renal failure. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 19, 1168–1172.
- Wiecek, A., Kokot, F., Chudek, J., & Adamczak. (2002). The adipose tissue – a novel endocrine organ of interest to the nephrologist. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 17, 191-195.

- Weisberg, S.P., McCann, D., & Desai, M. (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1798-1808.
- World Health Organization, Obesity : Preventing and Managing the Global Epidemic : Report of a WHO consultation on Obesity, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1998.
- World health organization Report. Fact sheel obesity and overweight. Disponible sur [http://www.who.int/gho/ncd/risk\\_factors/overweight/en/index.html](http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/index.html).
- Wu ,Y., Liu, Z., Xiang, Z., Zeng, C., Chen, Z., Ma, X., & Li, L. (2006) Obesity-related glomerulopathy: insights from gene expression profiles of the glomeruli derived from renal biopsy samples. *Endocrinology*, 47(1), 44-50.
- Xu, A.M., & Vanhoutte, P.M. Adiponectin and adipocyte fatty acid binding protein in the pathogenesis of cardiovascular disease. (2012). *American journal of ohysiology : Heart and Circulatory Physiology*, 302, 1231-1240.
- Yang, G., Badeanlou, J., Bielawski, J., Roberts, A.J., Hannum, Y.A. & Samad, F. (2008). Central role of ceramide biosynthesis in body weight regulation, energy metabolism, and the metabolic syndrome. *American Journal of Physiology : Endocrinology and Metabolism*, 297, 210-224.
- Ye, J., Gao, Z., Yin, J., & He, Q. (2007). Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob / ob and dietary obese mice, *70808*, 1118–1128.
- Yudkin, J.S. (2003). Adipose tissue, insulin action and vascular disease. inflammatory signals. *International Journal of Obesity related Metabolic Disorder*, 27(3), 25.
- Zhao, H. J., Wang, S., Cheng, H., Zhang, M., Takahashi, T., Fogo, A. B., Breyer, M. D., et al. (2006). Endothelial nitric oxide synthase deficiency produces accelerated nephropathy in diabetic mice. *Journal of the American Society of Nephrology* , 17(10), 2664–2669.
- Zhang, Q.J., Holland, W.L., Wilson, L., Tanner, J.M., Kearns, D., Cahoon, J.M., Pettey, D., & Losee, J. (2012). Ceramide mediates vascular dysfunction in diet-induced obesity by PP2A-mediated dephosphorylation of the eNOS-Akt complex. *Diabetes*, 61, 1848–1859.
- Zheng, W., Kollmeyer, J., Symolon, H., Monin, A., Munter, E., Wang, E., Kelly, S., et al. (2006). Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758, 1864-1884.
- Zoccali, C. (2009). Overweight, obesity and metabolic alterations in chronic kidney disease. *Contributions/ Macedonian Academy of Science and Art, Sections of Biological and Medical science*, 31, 17–31.