



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Quantification de l'expression des ARN messagers des enzymes qui métabolisent l'hyaluronan dans le rein. Influence de l'état d'hydratation

Dogne, Sophie

Award date:
1998

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.

12 JUIN 1998

FACULTES UNIVERSITAIRES
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

SECRETARIAT BIOLOGIE
F. U. N. D. P.
Rue de Bruxelles, 61
B - 5000 NAMUR

Faculté des Sciences

**QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION DES ARN MESSAGERS DES ENZYMES
QUI MÉTABOLISENT L'HYALURONAN DANS LE REIN.
INFLUENCE DE L'ÉTAT D'HYDRATATION.**

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

Sophie DOGNE

Juin 1998

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 59 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18. - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: secrétariat-biologie@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Quantification de l'expression des ARN messagers des enzymes qui métabolisent l'hyaluronan dans le rein. Influence de l'état d'hydratation

DOGNE Sophie

Résumé

L'acide hyaluronique, un composant majeur de la matrice extracellulaire de nombreux tissus dont la médullaire interne du rein, pourrait jouer un rôle dans de nombreux processus biologiques dont les phénomènes de concentration et de dilution des urines. Deux enzymes sont particulièrement impliquées dans le métabolisme de l'acide hyaluronique, l'hyaluronan-synthase pour sa synthèse et l'hyaluronidase pour sa dégradation.

Le laboratoire de Physiologie et Pharmacologie des FUNDP a démontré chez le rat que l'activité hyaluronidasique de fragments de médullaire rénale était plus élevée en état de déshydratation qu'en état d'hydratation.

Le but de ce travail a été de quantifier l'expression des messagers des gènes encodant les enzymes impliquées dans le turnover de ce glycosaminoglycan dans le rein de rat, en fonction de l'état d'hydratation. Par une méthode de PCR semi-quantitative, nous n'avons pas pu mettre en évidence une induction de l'expression du gène de l'hyaluronidase lors de la déshydratation. Néanmoins, des expériences en culture primaire de cellules tubulaires et interstitielles de la médullaire rénale du rat nous ont permis de mieux préciser la localisation de l'hyaluronidase.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 1998

Promoteur: B. Flamion

Au terme de ce travail, les remerciements me semblent plus que nécessaires. Je remercierai tout d'abord Mr Flamion de m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour l'enseignement dont il m'a fait bénéficier et pour son aide omniprésente.

Je remercierai ensuite le Révérend Père Devos, Anne Tibor, Isabelle Ernest et Isabelle Housen d'avoir accepté de faire partie du jury de délibération.

Au sein du laboratoire, j'adresse un énorme merci à Mme Mertens qui a toujours su trouver le temps de m'aider et les mots pour m'encourager. Je ne remercierai jamais assez Isabelle pour son aide, ses encouragements et sa faculté d'égayer la vie de tous les jours. Merci également à Pascale Boël pour son aide lors de la rédaction de ce mémoire. Merci à Mme Daelman, Mme Lacremans et Mr Dehousse pour leur disponibilité et leur aide.

Je tiens à remercier aussi le personnel du laboratoire de Physiologie et Physiopathologie pour les nombreux services rendus.

Un tout grand merci à Manu pour sa joie et sa bonne humeur !

Je remercie également mes parents et mes sœurs sans qui mes études n'auraient pas été possibles. Merci de m'avoir supportée pendant les dures périodes de fin d'année. Enfin, je remercie Sébastien pour sa patience, son aide et ses encouragements.

Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADH	Hormone antidiurétique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomal
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Bovin Serum Albumine
Cys	Cystéine
D.O.	Densité optique
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
DTT	Dithiothréitol
ESM	Erreur standard à la moyenne
GlcAB	Acide glucuronique
GlcNAc β	β N-acétyl glucosamine
HAS	Hyaluronan-synthase
Kb	Kilo bases
Kda	Kilo Daltons
mOsm	milliosmoles / Kg H ₂ O
nm	nanomètre
pb	Paire(s) de bases
PEG-8000	Polyéthylèneglycol
rpm	rotations par minutes
SDS	Sodium dodécyl sulfate
UDP	Uridine diphosphate

1	INTRODUCTION	1
1.1	L'ACIDE HYALURONIQUE	1
1.1.1	STRUCTURE	1
1.1.2	FONCTIONS	2
1.1.3	DÉGRADATION	2
1.2	LES HYALURONIDASES	3
1.2.1	CLASSIFICATION	3
1.2.2	CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DE DEUX FORMES D'HYALURONIDASES	4
1.2.3	AUTRES LOCALISATIONS	5
1.2.4	FONCTIONS DE L'HYALURONIDASE RÉNALE	6
1.3	LES HYALURONAN- SYNTHASES	7
1.3.1	DESCRIPTION	7
1.3.2	MÉCANISME D'ACTION	7
1.3.3	CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE	8
1.3.4	CARACTÉRISTIQUES STRUCTURELLES ET FONCTIONNELLES	9
1.4	LE REIN ET L'ÉQUILIBRE HYDRIQUE	10
1.4.1	INTRODUCTION	10
1.4.2	ORGANISATION STRUCTURELLE DU REIN	11
1.4.3	LA DILUTION DES URINES	12
1.4.4	LA CONCENTRATION DES URINES	13
1.4.5	L'HORMONE ANTIDIURÉTIQUE	14
1.5	L'INTERSTITIUM RÉNAL	15
1.5.1	DESCRIPTION GÉNÉRALE	15
1.5.2	L'INTERSTITIUM MÉDULLAIRE	16
1.5.2.1	Circulation sanguine dans la médullaire	16
1.5.2.2	Importance de l'espace interstitiel médullaire	17
1.5.2.3	Composition de l'interstitium	17
1.5.2.4	Caractéristiques des cellules interstitielles	17
1.5.2.5	Fonction des cellules interstitielles	18
1.6	BUTS DU TRAVAIL	19
2	MATÉRIEL ET MÉTHODES	20
2.1	PRÉPARATION DES RATS	20
2.1.1	HYDRATATION DES RATS	20
2.1.2	DÉSHYDRATATION DES RATS	21
2.1.3	TRAITEMENT DES INSTRUMENTS POUR LA PRÉPARATION D'ARN	21
2.1.4	PRÉLÈVEMENT DES FRAGMENTS DE REIN	21
2.2	MÉTHODES RELATIVES À L'ARN	22
2.2.1	EXTRACTION D'ARN TOTAL	22
2.2.1.1	RNeasy mini Kit (Qiagen)	22
2.2.1.1.1	Solutions utilisées	22
2.2.1.1.2	Protocole pour les tissus	22
2.2.1.1.3	Protocole pour les cellules	23
2.2.1.2	Extraction par RNeasy midi Kit (Qiagen)	24
2.2.2	QUANTIFICATION DE L'ARN	24
2.2.3	ELECTROPHORÈSE SUR GEL D'AGAROSE	25
2.2.3.1	Solutions utilisées	25
2.2.3.2	Préparation des échantillons	25
2.2.3.3	Préparation du gel non dénaturant	25

2.2.3.4	Migration	26
2.2.4	PRÉPARATION D'ADNC PAR TRANSCRIPTION RÉVERSE	26
2.2.4.1	Traitement préalable à la DNase	26
2.2.4.1.1	Solutions utilisées	26
2.2.4.1.2	Protocole	27
2.2.4.2	La réaction de transcription reverse	27
2.2.4.2.1	Solutions utilisées	27
2.2.4.2.2	Protocole	27
2.2.4.3	Contrôle de qualité des ADNc synthétisés par PCR	28
2.3	MÉTHODES RELATIVES À L'ADN	28
2.3.1	MILIEU DE CULTURE POUR LES BACTÉRIES	28
2.3.2	MINI-PRÉPARATION D'ADN PLASMIDIQUE	29
2.3.2.1	Solutions utilisées	29
2.3.2.2	Protocole	29
2.3.3	MIDI-PRÉPARATION D'ADN PLASMIDIQUE	30
2.3.3.1	Solutions utilisées	30
2.3.3.2	Protocole	30
2.3.4	BACTÉRIES COMPÉTENTES	31
2.3.4.1	Méthode au CaCl ₂	31
2.3.4.2	Bactéries électrocompétentes	32
2.3.5	TRANSFORMATION D'ADN DANS DES BACTÉRIES	32
2.3.5.1	Transformation par choc thermique	33
2.3.5.2	Electroporation	33
2.3.6	RESTRICTION D'ADN	33
2.3.6.1	Les tampons de restriction	34
2.3.6.2	Les enzymes de restriction	34
2.3.6.3	Protocole	34
2.3.7	LA LIGATION D'ADN	35
2.3.7.1	Tampon de ligation	35
2.3.7.2	Réaction de ligation	35
2.3.8	POLYMÉRISATION	36
2.3.8.1	Tampon de la T4 DNA polymérase	36
2.3.8.2	Réaction de polymérisation par la T4 DNA polymérase	36
2.3.8.3	Réaction avec la Klenow	37
2.3.9	LA DÉPHOSPHORYLATION	37
2.3.9.1	Tampon de la phosphatase	37
2.3.9.2	Réaction de déphosphorylation	38
2.3.10	EXTRACTION AU PHÉNOL	38
2.3.11	PRÉCIPITATION À L'ÉTHANOL	38
2.3.12	RÉCUPÉRATION DE FRAGMENTS D'ADN PAR GENECLEAN (BIOLABS)	39
2.3.13	RÉCUPÉRATION D'UN PETIT FRAGMENT D'ADN PAR NUCLEOSPIN EXTRACT (MACHERY NAGEL)	40
2.3.13.1	Les solutions utilisées	40
2.3.13.2	Protocole	40
2.3.14	QUANTIFICATION D'ADN PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE	40
2.3.15	MIGRATION D'ADN SUR GEL D'AGAROSE.	41
2.3.15.1	Solutions utilisées	41
2.3.15.2	Réalisation du gel et dépôt des échantillons	42
2.3.16	MIGRATION D'ADN SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE	42
2.3.16.1	Les solutions utilisées	43
2.3.16.2	Composition du gel	43
2.3.16.3	Protocole	44
2.3.16.4		45
	Révélation du gel	45

2.3.16.4.1	Le bain de bromure d'éthidium	45
2.3.16.4.2	La radioactivité	45
2.4	AMPLIFICATION D'ADN PAR PCR	45
2.4.1	DESCRIPTION GÉNÉRALE	45
2.4.2	PCR COMPÉTITIVE	46
2.4.2.1	Introduction	46
2.4.2.2	Principe de la PCR compétitive	47
2.4.2.3	Nature du compétiteur	47
2.4.3	TAMPON DE LA TAQ DNA POLYMÉRISE.	48
2.4.4	LA RÉACTION PCR	48
3	RÉSULTATS	49
3.1	L'ADNC DE REIN DE RATS HYDRATÉS ET DÉSHYDRATÉS	49
3.1.1	PRÉPARATION DES RATS	49
3.1.2	EXTRACTION DE L'ARN DES TISSUS	49
3.1.3	EXTRACTION DE L'ARN DE CELLULES RÉNALES EN CULTURE	50
3.1.4	SYNTHÈSE DES ADNC	51
3.2	MISE AU POINT DES PCR COMPÉTITIVES	51
3.2.1	CONSTRUCTION DES COMPÉTITEURS	51
3.2.1.1	Le "compétiteur Hyal"	52
3.2.1.1.1	L'ADNC de Hyal2 de rein de rat	52
3.2.1.1.2	Les constructions pSD-Hyal et pHyal-st.	52
3.2.1.2	Le "compétiteur Synthase"	53
3.2.1.2.1	Un plasmide contenant un fragment PCR d'une synthase rénale de rat	53
3.2.1.2.2	La construction pSyn-st	54
3.2.1.3	Le "compétiteur GAPDH"	54
3.2.1.3.1	Un plasmide contenant un fragment PCR de la GAPDH de rat	54
3.2.1.3.2	La construction pGAPDH-st	54
3.2.2	RÉACTION DE PCR COMPÉTITIVE	55
3.2.2.1	Mise au point des conditions	55
3.2.2.2	Test de parallélisme	56
3.3	LA PCR SEMI-QUANTITATIVE	57
3.3.1	INTRODUCTION	57
3.3.2	LA MÉDULLAIRE INTERNE	58
3.3.3	LA MÉDULLAIRE EXTERNE	58
3.3.4	LE CORTEX	59
3.3.5	LES CELLULES INTERSTITIELLES ET TUBULAIRES	59
4	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	60
4.1	CHOIX DES TECHNIQUES	60
4.2	RÉSULTATS CONCERNANT L'EXPRESSION DE LA HYALURONAN-SYNTASE	61
4.3	RÉSULTATS DES PCR SEMI-QUANTITATIVES	62
4.4	RÉSULTATS DES PCR SUR LES CELLULES RÉNALES CULTIVÉES	64
5	BIBLIOGRAPHIE	66

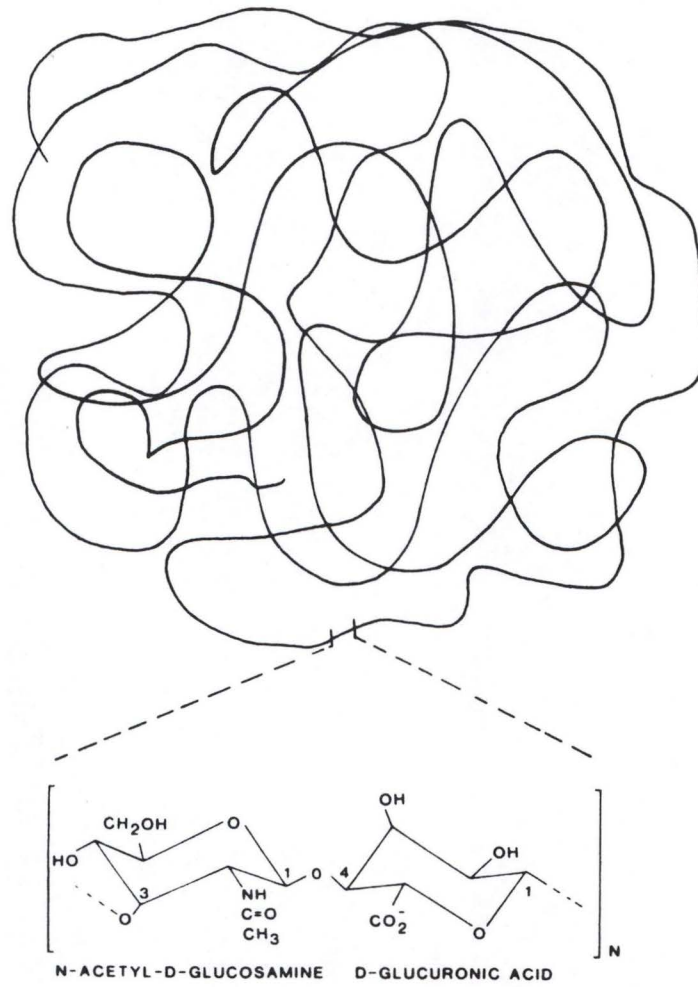


Figure 1.1 : Structure de l'hyaluronan, polymère constitué d'unités disaccharidiques répétitives

1 Introduction

1.1 L'acide hyaluronique

1.1.1 Structure

L'acide hyaluronique, ou hyaluronan (Fig. 1.1), est un polysaccharide de haut poids moléculaire chargé négativement, qui est présent dans la matrice extracellulaire de la plupart des tissus, en particulier dans les tissus conjonctifs lâches et dans la peau (Laurent and Fraser, 1992). Il faut savoir que l'acide hyaluronique est également présent en grande quantité dans la médullaire interne du rein (Rowen and Law, 1981 ; Pitcock *et al.*, 1988 ; Flamion *et al.*, 1997).

Ce polymère fut purifié en 1934 par Meyer et Palmer à partir du corps vitreux de l'oeil et ces auteurs lui donnèrent le nom d'acide hyaluronique, du grec *hyaloid* : vitreux (Meyer and Palmer, 1934). L'acide hyaluronique, qu'il serait plus correct d'appeler hyaluronan, fait partie de la famille des glycosaminoglycans, c'est-à-dire des polysaccharides contenant des hexosamines. Dans son cas, il s'agit de la β -N-acétyl-glucosamine (GlcNAc β), qui est liée à l'acide D-glucuronique (GlcA β) par une liaison β (1-4) (Fig 1.1). Cette unité dissaccharide peut être répétée jusqu'à 30 000 fois, ce qui porte le poids moléculaire d'une molécule d'acide hyaluronique à plusieurs millions.

Selon Scott (1989), la molécule serait stabilisée par des ponts hydrogènes parallèles à l'axe de la chaîne et pourrait prendre une structure enroulée comme un pelote lorsqu'elle est en solution. Cette pelote peut être vue comme une sphère hautement hydratée, la plupart des molécules d'eau étant immobilisées mécaniquement dans la pelote et non liées de manière covalente au polysaccharide (Scott, 1992) . Chez les vertébrés, l'hyaluronan existe sous plusieurs formes. Dans la matrice extracellulaire, il peut être fermement intercalé entre des protéines de liaison ("*HA-binding proteins*") et des protéoglycans, associé aux cellules ou lié à la cellule par une protéine spécifique qui lui sert de récepteur (par exemple le récepteur CD44) (Knudson and Knudson, 1993 ; Stamenkovic and Aruffo, 1994). Une bonne partie de

l'acide hyaluronique de l'organisme se trouve sous forme libre en solution dans la circulation lymphatique ou vasculaire.

1.1.2 Fonctions

Ce polymère a longtemps été considéré comme un simple composant passif de l'espace intercellulaire et de la capsule de certaines bactéries. C'est dans les années 80 que l'intérêt pour cette macromolécule ubiquiste a grandi, à la suite de la découverte de récepteurs spécifiques à l'acide hyaluronique sur les cellules et de son implication dynamique dans de nombreux processus biologiques. En effet, il semble être impliqué dans la migration et dans la différenciation des cellules pendant l'embryogenèse, ainsi que dans la régulation de l'organisation de la matrice extracellulaire et dans la mobilité cellulaire (Laurent and Fraser, 1992). Un pic d'hyaluronan est observable juste avant la mitose, ce qui pourrait empêcher les cellules de se dissocier les unes des autres et de se séparer de la matrice extracellulaire lors des divisions (Frost *et al.*, 1996). L'acide hyaluronique inhibe la différenciation cellulaire en créant un environnement de prolifération. Il est également présent en concentration importante dans le stroma des tumeurs malignes (Knudson, 1996). Il est fort probable que l'acide hyaluronique soit inclus dans de nombreux processus métaboliques, car son turnover est beaucoup plus rapide que celui d'une simple protéine de la matrice extracellulaire (Reed and Laurent, 1992).

Malgré l'importance biologique de l'acide hyaluronique, son catabolisme et son turnover ne sont pas encore bien compris.

1.1.3 Dégradation

Les enzymes impliquées dans le catabolisme de l'acide hyaluronique sont les **hyaluronidases**. La dégradation de l'acide hyaluronique peut se faire à différents endroits de l'organisme, dans le foie, le sang, les macrophages et dans de nombreux tissus où l'hyaluronan a été synthétisé.

Dans le foie, la dégradation est effectuée par les cellules endothéliales (sinusoïdales). Ces cellules portent un récepteur spécifique pour l'endocytose de l'acide hyaluronique, le récepteur CD44. Après endocytose, l'hyaluronan se retrouverait dans les lysosomes qui contiennent les enzymes de dégradation : les hyaluronidases, β -glucuronidases, et β -N-acétylglucosaminidases (Laurent and Fraser, 1992).

Dans le sang, le turnover de l'acide hyaluronique est également élevé. Néanmoins, une grande partie n'atteint jamais la circulation générale car elle est dégradée au niveau des ganglions lymphatiques. Quantitativement, ce site de dégradation est même plus important que le foie (Laurent and Fraser, 1992).

En 1929, Duran-Reynals a découvert dans des extraits testiculaires un "*spreading factor*" ou facteur de diffusion qui facilite la diffusion de différentes substances lorsqu'il est injecté par voie sous cutanée. Des recherches ultérieures ont permis de découvrir que ce "*spreading factor*" était une enzyme dégradant l'acide hyaluronique (Meyer, 1947). Plus tard, elle a été dénommée PH20. On démontra par la suite qu'il existe au moins trois types d'hyaluronidases dégradant l'hyaluronan par des mécanismes différents (Meyer, 1971).

1.2 Les hyaluronidases

1.2.1 Classification

Ces enzymes font partie de la classe des endoglucosaminidases (Meyer, 1971), c'est-à-dire qu'elles peuvent couper des liaisons saccharidiques internes aux polysaccharides qui comprennent des glucosamines, par exemple dans l'acide hyaluronique qui contient des N-acétylglucosamines.

Un premier groupe est constitué d'endo- β -N-acétyl-D-hexosaminidases (EC 3.2.1.35) qui peuvent dégrader à la fois l'acide hyaluronique (polymère de N-acétylglucosamine et d'acide D-glucuronique) et la chondroïtine sulfate (polymère d'acide D-glucuronique et de N-acétylgalactosamine avec le groupement sulfate en position 4 ou 6). Ces enzymes produisent 90 % de tétrasaccharides (U.A.U.A, où U représente l'acide glucuronique et A, la

N-acétylhexosamine) et 10% de disaccharides. L'exemple-type de ce groupe est la PH20 (ou 2B1 chez le rat) que l'on trouve en fait sur le spermatozoïde (Lathrop *et al.*, 1990). On trouve également une enzyme de ce type dans les lysosomes au sein de divers tissus (foie, rein, tissu synovial, glandes sous-maxillaires, etc) (Frost *et al.*, 1996). Contrairement à la PH20, qui agit de façon maximale à pH neutre, les hyaluronidases lysosomales ont un pH optimal proche de 4. Des enzymes ayant des propriétés semblables sont présentes dans le venin de certains serpents et d'arthropodes.

Un deuxième groupe d'hyaluronidases contient la forme trouvée chez les sangsues (*Hirudo medicinalis*). L'enzyme est unique parmi les hyaluronidases en ce sens qu'il s'agit d'une β -endoglucuronidase (EC 3.2.1.36) qui clive les liaisons $\beta(1-3)$. Elle est spécifique de l'acide hyaluronique et donne un tétrasaccharide (A.U.A.U). Cette enzyme serait localisée dans les glandes salivaires de la sangsue.

Enfin, le dernier groupe est constitué d'hyaluronidases bactériennes qui sont des endo- β -N acétylglucosaminidases (EC 4.2.99.1) et produisent principalement des disaccharides insaturés désulfatés, leur pH d'activité optimum (6 à 9) est plus élevé que celui des autres hyaluronidases, excepté la PH20.

1.2.2 Caractérisation moléculaire de deux formes d'hyaluronidases

Comme nous venons de le signaler, les hyaluronidases sont présentes dans d'innombrables organismes, depuis les bactéries jusqu'aux mammifères en passant par les venins de serpents, de guêpes, de frelons, de scorpions, d'araignées, etc. L'enzyme permet une diffusion plus aisée des composants du venin grâce à la dégradation de l'hyaluronan. Des recherches ont été réalisées pour caractériser en détail ces enzymes, en particulier celle du venin d'abeille (Kriel, 1995) Il s'agit d'une glycoprotéine dérivée d'un précurseur contenant un peptide signal et un pro-segment. Une fois mature, l'enzyme comporte 349 acides aminés dont 4 cystéines. Plus tard, on identifia également l'enzyme du venin de frelon qui est constituée de 331 acides aminés.

L'hyaluronidase suivante qui a été caractérisée du point de vue moléculaire est la protéine PH20 (Lathrop *et al.*, 1990 ; Kriel, 1995). Cette protéine est présente dans la partie postérieure de la tête du spermatozoïde des mammifères, ainsi que dans leur membrane acrosomale. Cette PH20 est à l'origine synthétisée sous forme d'un polypeptide de 64 KDa et liée à la membrane par une attache glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Kriel, 1995). Au cours de la maturation du spermatozoïde, une partie de la protéine est scindée en deux segments reliés par des ponts disulfures. Lorsqu'on compare les séquences de l'hyaluronidase du venin d'abeille et cette protéine PH20 du cobaye, on obtient 36% d'identité pour une région commune de 300 acides aminés. La protéine PH20 possède bien une activité hyaluronidasique, mais celle-ci est maximale à pH neutre. La partie responsable de l'activité réside dans le domaine amino-terminal. On a démontré que la PH20 joue un rôle crucial dans la fertilisation (Lin *et al.*, 1994). En effet, le spermatozoïde doit traverser une couche de cellules du cumulus entourant l'œuf, et ces cellules sont enfoncées dans une matrice riche en acide hyaluronique. Des inhibiteurs de la PH20 sont à l'étude comme produits contraceptifs potentiels (Li *et al.*, 1997).

1.2.3 Autres localisations

a) Une activité de dégradation de l'acide hyaluronique dans *le plasma* humain a été décrite de longue date, mais la purification de cette enzyme s'est avérée très difficile. Cette hyaluronidase du plasma fut ensuite clonée et purifiée en 1997 par Frost *et al* qui lui donnèrent le nom de Hyal1. Cette protéine a un poids moléculaire de 57 KDa. L'ADNc de Hyal1 contient une phase ouverte de lecture de 1308 pb qui code pour une protéine de 435 acides aminés. La séquence en acides aminés de cette hyaluronidase a été comparée à celle de la PH20 et présente 40 % d'identité (Frost *et al.*, 1997). La présence de l'ARN messager de Hyal1 a également été détectée dans le rein, le foie, le coeur, le poumon, le placenta et les muscles squelettiques mais pas au niveau du cerveau. Néanmoins cette Hyal1 est la seule hyaluronidase présente dans le plasma humain quoiqu'à très faible concentration (60 ng/ml).

b) *Le rein et le foie* semblent être les deux organes majeurs de dégradation de l'hyaluronan puisque l'occlusion des vaisseaux hépatiques ou des vaisseaux rénaux conduit à une augmentation rapide du taux d'acide hyaluronique circulant dans le sang (Engström-

Laurent and Hellström, 1990). Les enzymes dans ces deux organes se trouvent probablement dans les lysosomes (Mahadevan *et al.*, 1969) et la dégradation de l'acide hyaluronique devrait donc se faire après endocytose du polymère. Ces enzymes n'ont pas encore été clonées de façon formelle, mais le laboratoire de Physiologie et Pharmacologie des FUNDP a récemment obtenu, au départ de l'ARN messager du rein de rat, la séquence de l'ADNc d'une protéine appelée Hyal2, qui est manifestement différente de Hyal1 et est vraisemblablement une hyaluronidase exprimée dans de nombreux tissus (Flamion *et al.*, 1998)

c) Une activité hyaluronidasique est également observée au niveau *des macrophages* alvéolaires (Goggins *et al.*, 1968). L'enzyme a une activité optimale à pH 3,9 et ne fonctionne plus au delà de pH 5. Ces macrophages font partie intégrale de nombreux tissus et pourraient intervenir dans le turnover de l'acide hyaluronique à plusieurs endroits de l'organisme.

d) L'activité hyaluronidasique *des fibroblastes* est nulle ou très faible excepté dans certains fibroblastes de la peau ou de l'utérus (Frost *et al.*, 1996)

1.2.4 Fonctions de l'hyaluronidase rénale

Ginetzinsky a proposé en 1958 un modèle d'action de l'hormone antidiurétique (ADH) qui impliquait la participation d'une hyaluronidase rénale (Ginetzinsky, 1958). Ce modèle a dû être abandonné lorsqu'on a découvert les mécanismes d'action exacts de l'ADH. Cependant, il est intéressant de rappeler l'hypothèse de Ginetzinsky, car certains de ses éléments pourraient être remis à jour. Cet auteur proposait que pendant la déshydratation, après libération d'ADH, il y aurait une sécrétion apocrine d'hyaluronidase dans la lumière des tubules collecteurs. Cette enzyme dépolymériserait alors l'acide hyaluronique de la matrice extracellulaire comprise entre ces cellules tubulaires, ouvrant des voies de passage pour la réabsorption des molécules d'eau. Depuis l'abandon forcé de cette théorie, très peu d'études ont envisagé les rôles potentiels d'une hyaluronidase rénale. Des auteurs anglais ont toutefois démontré chez le rat, en 1981, que l'administration d'un anticorps dirigé contre l'hyaluronidase urinaire diminuait les capacités de concentration urinaires, alors qu'un

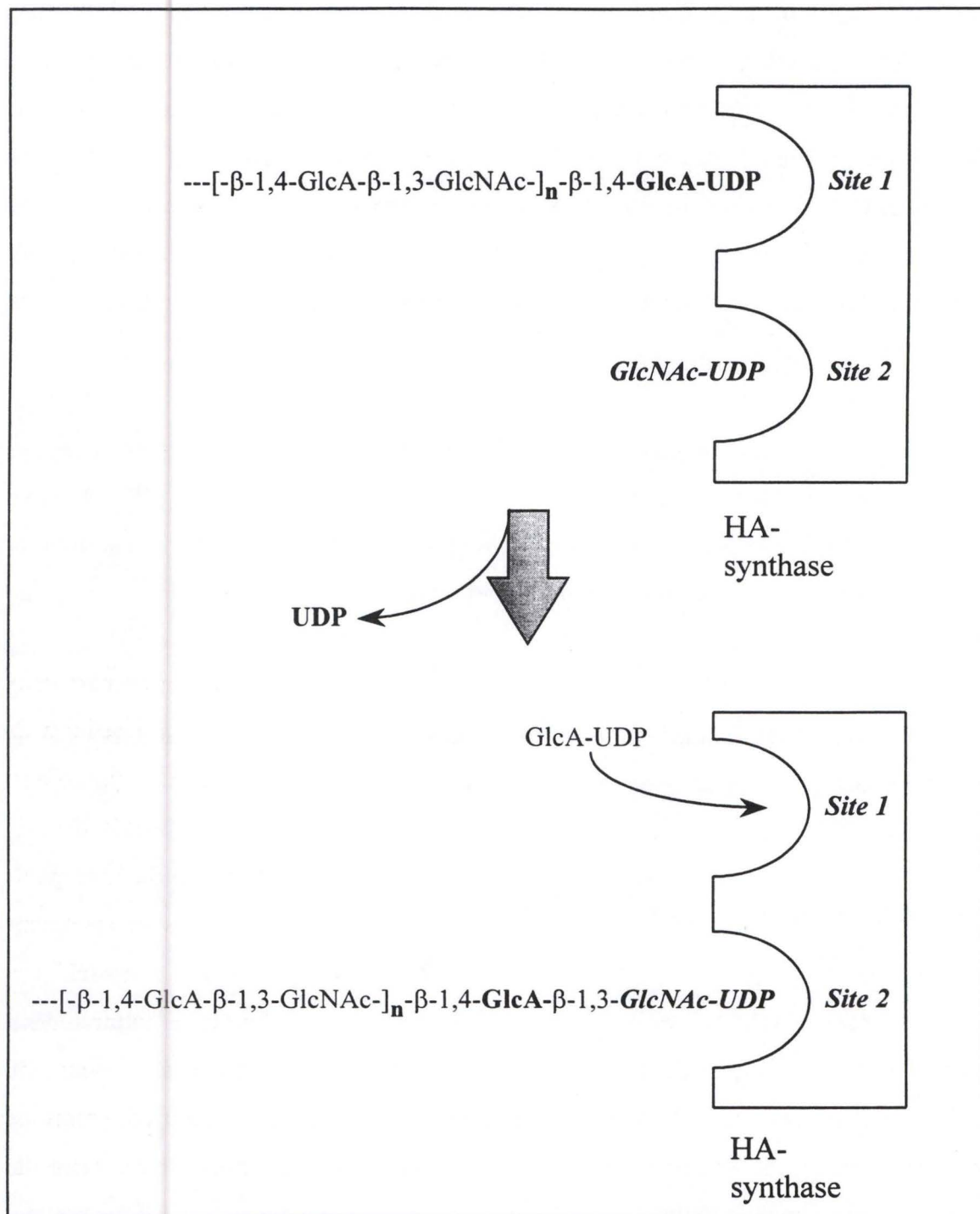


Fig. 1.2. Mécanisme d'action proposé de l'hyaluronan-synthase. Les unités disaccharidiques de l'hyaluronan sont synthétisées par extension à l'extrémité réductrice, en deux temps (selon Prehm, 1983).

anticorps dirigé contre l'hyaluronidase testiculaire n'avait aucun effet de ce genre (Law and Rower, 1981). De plus, dans le laboratoire de Physiologie et Pharmacologie, il a été montré que l'activité hyaluronidasique des fragments de médullaire rénale de rat déshydraté était plus élevée que celle des mêmes fragments prélevés chez des rats hydratés (Flamion *et al.*, 1997). La caractérisation moléculaire des différentes formes d'hyaluronidase rénale devrait permettre de définir plus clairement le rôle de cette enzyme dans les mécanismes de concentration et dilution urinaire ainsi que son rôle éventuel dans d'autres fonctions rénales. Mon travail constitue une première étape dans ce sens.

1.3 Les hyaluronan- synthases

1.3.1 Description

L'hyaluronan, présent dans le milieu extracellulaire, est synthétisé par de nombreux types cellulaires comme les fibroblastes. Chez les bactéries comme dans les cellules de mammifères, l'acide hyaluronique est synthétisé au niveau de la membrane plasmique, contrairement aux autres glycosaminoglycans qui sont généralement synthétisés dans le Golgi (Weigel *et al.*, 1997). Dans la membrane s'assemble un polymère de haut poids moléculaire qui, au fur et à mesure de sa synthèse, est excrété à travers la membrane plasmique dans l'espace extracellulaire pour s'intégrer à la matrice, rester associé aux cellules ou former la capsule de certaines bactéries. L'extrusion de la chaîne grandissante vers l'espace extracellulaire, simultanément à la biosynthèse, permet une élongation plus aisée du polymère. C'est ce mécanisme qui permet la formation d'un acide hyaluronique de taille exceptionnelle. Si la synthèse était confinée à l'intérieur du Golgi ou dans des compartiments post-golgiens, la longueur du polymère serait certainement plus limitée.

1.3.2 Mécanisme d'action

En 1983, Prehm propose un mécanisme biochimique de synthèse pour l'hyaluronan qui est différent de celui des autres glycosaminoglycans (Fig. 1.2). Il suggère que cette synthèse se passe à l'extrémité réduite de la chaîne grandissante et en deux sites différents

sur l'enzyme (Prehm, 1983 a et b). Dans ce mécanisme, le sucre terminal réduit, qu'il s'agisse de N-acétyl-D-glucosamine ou d'acide D-glucuronique, serait lié de manière covalente à un UDP en position terminale et placé ensuite dans un premier site actif de l'enzyme (par exemple, le GlcA-UDP dans le site 1). Le sucre suivant à ajouter serait transféré, à partir du site 2 de l'enzyme et sous la forme sucre-UDP, vers l'extrémité du sucre précédent. L'UDP du sucre déjà lié serait alors relargué pour permettre la liaison avec le prochain sucre-UDP. A ce moment, la chaîne grandissante se trouve au site 2 de l'enzyme et elle repassera au site 1 lors de l'ajout du sucre suivant.

1.3.3 Caractérisation moléculaire

De nombreux efforts ont été réalisés dans le but de purifier l'hyaluronan-synthase (HAS) à partir de souches de *Streptococci* et à partir de cellules eucaryotes. Mais ces efforts sont restés sans succès pratiquement jusqu'en 1993, quand De Angelis *et al.* ont cloné et caractérisé le gène codant pour la première hyaluronan-synthase, appelée protéine HasA chez *Streptococcus* (DeAngelis et al., 1993). On sait que cette protéine fait partie de l'opéron nécessaire à la bactérie pour la synthèse de l'acide hyaluronique. Cet opéron chez *S. pyogenes* encode également deux autres protéines : une déshydrogénase (HasB) qui convertit l'UDP-glucose en acide UDP-glucuronique, un des substrats pour la synthase, et une phosphorylase (HasC) qui reconvertit le glucose 1-phosphate et l'UTP en UDP-glucose.

L'ADNc de la synthase cloné chez *S. pyogenes* (spHAS) a été comparé aux séquences de la synthase de la chitine (identique à 5-10%) et de la protéine DG42 de *Xenopus laevis* exprimée pendant la gastrulation (identique à 30 %). En incubant la protéine spHAS avec de l'UDP-GlcA et de l'UDP-GlcNAc, De Angelis *et al.* découvrirent qu'elle synthétisait un acide hyaluronique de haut poids moléculaire, ce qui permet de déduire que les deux activités acétyl-transférases nécessaires à la synthèse de l'acide hyaluronique sont catalysées par la même protéine.

En 1996, le premier ADN complémentaire d'une hyaluronan-synthase eucaryote fut identifié (Itano and Kimata, 1996). Il révéla que la HAS fait partie d'une famille multigénique codant pour différents isoenzymes. Rapidement, deux gènes furent découverts

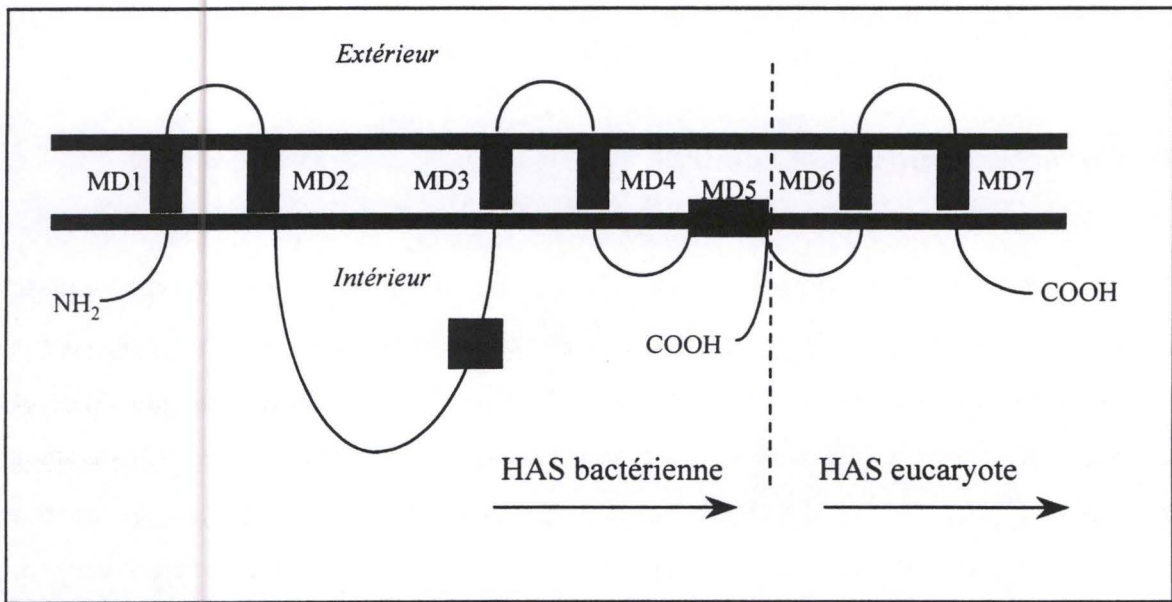


Fig. 1.3. Topologie membranaire de l'hyaluronan-synthase. MDx, domaines membranaires.

chez les mammifères (HAS1 et HAS2) ; à l'heure actuelle, un troisième gène a été découvert (HAS3) (Weigel *et al.*, 1997). Ces trois gènes se trouvent sur différents autosomes (Spicer and McDonald, 1998), ce qui renforce l'idée que ces gènes ont vu le jour par duplication du gène ancestral. Les produits de ces gènes partagent 55 à 71% d'identité de séquence. Ces protéines montrent une homologie de séquence non seulement avec spHAS, mais aussi avec DG42 et d'autres β -glycosaminyltransférases comme la protéine NodC rhizobiale, la chitine-synthase, etc. (Spicer & McDonald, 1998). On a même décrit récemment une hyaluronan-synthase appartenant au virus PBCV-1 des algues *Chlorella* (DeAngelis *et al.*, 1997).

1.3.4 Caractéristiques structurelles et fonctionnelles

La structure de toutes les protéines HAS est similaire : elles comprennent un large domaine central et des grappes de 2 à 3 domaines transmembranaires ou associés à la membrane, et cela aux deux extrémités de la protéine (Fig. 1.3). La région catalytique de cette enzyme se trouve probablement au niveau du domaine central dont la longueur varie de 264 acides aminés chez *S. pyogenes* à 307 et 328 acides aminés chez les eucaryotes.

Pour beaucoup de synthases, le nombre exact et l'orientation des domaines transmembranaires, ainsi que l'organisation topologique des boucles intra- et extracellulaires, ne sont pas encore connus. La protéine spHAS est la seule à être partiellement caractérisée : il semble que les parties N-terminale et C-terminale et le large domaine central se trouvent, en fait, à l'intérieur de la cellule (Weigel *et al.*, 1997). Cette protéine comporte six cystéines, alors qu'on en trouve 13 ou 14 chez HAS1, HAS2 et HAS3. La cystéine qui se trouve à la même position (Cys-225) chez les différents membres de la famille des synthases semble avoir un rôle important puisque toute modification de cette cystéine aboutit à une enzyme partiellement inhibée.

La famille des HAS se caractérise aussi par le nombre important de fonctions séparées qui sont nécessaires pour la synthèse de l'hyaluronan. L'enzyme doit probablement associer six activités différentes : des sites de liaison pour les différents précurseurs sucres, deux activités glycosyl-transférase distinctes, au moins un site pour accrocher la chaîne du polymère grandissant, et une activité de transfert qui pousse le polymère vers l'extérieur de la

cellule sucre par sucre. Puisque les HAS eucaryotes sont 40% plus grandes que spHAS, leurs domaines pourraient élaborer des fonctions supplémentaires comme le trafic intracellulaire, la localisation et la régulation de l'enzyme, ainsi que ses interactions avec les autres composants cellulaires (Weigel et al., 1997).

La découverte de plusieurs gènes codant pour différentes HAS chez les vertébrés renforce l'idée que l'acide hyaluronique est un important régulateur de la cellule et pas simplement un composant passif des tissus.

1.4 Le rein et l'équilibre hydrique

1.4.1 Introduction

Le rein assure l'homéostasie du milieu intérieur, c'est-à-dire le liquide qui baigne toutes nos cellules. Pratiquement tous les organes de notre corps participent d'une façon ou d'une autre à cette homéostasie mais le rein est celui qui joue le plus grand rôle dans ce maintien. Cela était déjà connu par Hower W Smith qui notait que "*la constance du milieu intérieur est en grande partie une conséquence de l'activité des reins, qui dans tous les cas excrètent une urine d'une composition telle qu'elle évite les tendances à la déviation de la composition du plasma*" (Smith, 1937).

Le rein contrôle l'élimination ou la rétention de l'eau et du NaCl ainsi que l'excrétion d'électrolytes comme le potassium, le calcium, le magnésium, les phosphates, etc. Il régule l'osmolalité et le volume des liquides extracellulaires, assure l'équilibre acide-base (en contrôlant l'élimination des protons) et permet l'excrétion de différents produits métaboliques comme l'urée, la créatinine et l'acide urique. Toutes ces excrétions doivent, néanmoins, être régulées indépendamment les unes des autres. Par exemple, lors d'un apport d'eau sans modification de l'apport en solutés, le rein doit pouvoir excréter la quantité d'eau appropriée sans perturber l'excrétion des solutés (Bankir *et al.*, 1989; Guyton and Hall, 1996). Pour ce faire, le rein est capable d'émettre de grandes quantités d'urines très diluées (jusqu'à une osmolalité minimum d'environ 50 mOsm chez l'homme) ou, inversement, de petites quantités d'urines très concentrées (jusqu'à un maximum de 1400 mOsm chez

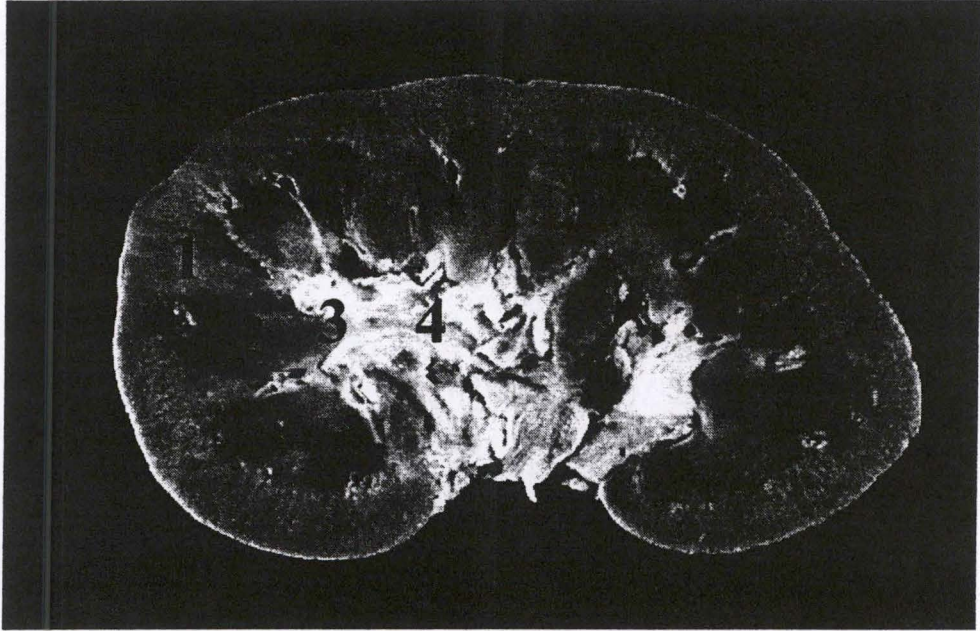


Fig. 1.4. Coupe de rein humain. 1, cortex ; 2, médullaire interne (pyramide) ; 3, papille ; 4, pelvis.

l'homme, mais beaucoup plus chez certains animaux dont le rat de laboratoire) (Bankir and de Rouffignac, 1985).

La capacité de concentration et de dilution des urines par le rein dépend de son organisation en tubules et en éléments vasculaires dans ses différentes régions. L'élimination ou la rétention d'eau par le rein sont contrôlées essentiellement par l'hormone antidiurétique (ADH) ou vasopressine. Lors d'un apport en eau abondant, la sécrétion d'ADH est inhibée et l'urine sera diluée (diurèse) ; dans le cas contraire, où l'eau doit être conservée tout en éliminant les solutés apportés par l'alimentation, l'ADH est alors sécrétée. Le mécanisme d'action de cette hormone sera détaillé ci dessous.

1.4.2 Organisation structurelle du rein

Le rein est un organe en forme de haricot. Ses relations avec l'extérieur se font par le hile où passent les vaisseaux, les nerfs et les voies urinaires (pelvis). Il est constitué d'un cortex qui forme toute sa partie externe et d'une zone interne, la médullaire (Fig.1.4). Chez l'homme, la médullaire est divisée en 8 à 20 pyramides dont la base se trouve à la jonction cortico-médullaire et la pointe s'appelle papille. Chez le rat, l'animal de laboratoire qui nous servira de modèle, la situation est plus simple puisque la médullaire ne constitue qu'un seul cône terminé par la papille. Le rein de rat est unipapillaire et sa médullaire a donc une forme de champignon. Au sein de la médullaire, on distingue deux zones : la médullaire externe, riche en vaisseaux sanguins, qui fait directement suite au cortex, et la médullaire interne qui comprend la papille (Tisher and Madsen, 1998).

L'unité fonctionnelle du rein est le néphron composé d'un corpuscule de Malpighi ou glomérule, toujours situé dans la zone corticale, et d'un long tubule qui va se modifier durant son parcours vers la pointe de la papille (Fig 1.5). Chaque rein humain comporte 1 à 1,3 millions de néphrons, tous capables de former de l'urine. Chaque néphron est un long canal de deux ou trois centimètres de long et de quelques centièmes de millimètres de diamètre (de Rouffignac et Bankir, 1990).

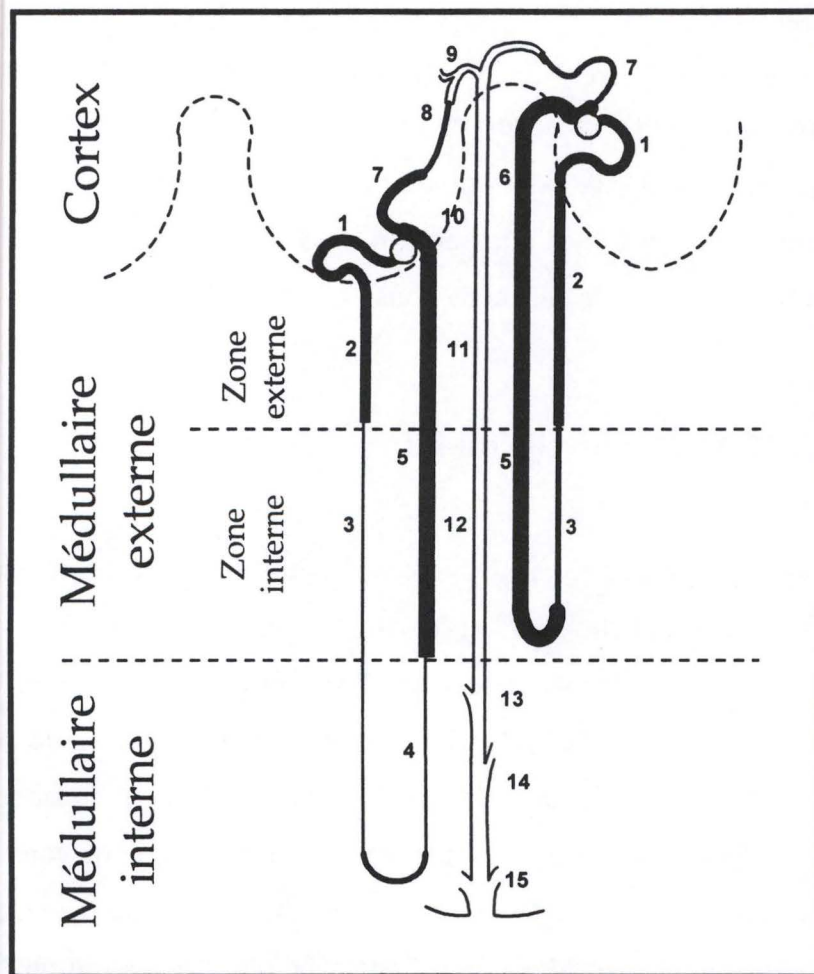


Fig. 1.5. Schéma du néphron. A gauche, une anse longue ; à droite, une anse courte. Les différents segments sont : 1, tubule proximal contourné; 2, tubule proximal droit; 3, branche descendante de l'anse de Henlé; 4, segment grêle ascendant de l'anse de Henlé; 5 et 6, segment large ascendant de l'anse de Henlé (médullaire et corticale); 7, tubule contourné distal; 8, tubule connecteur; 9 et 10, tubule collecteur cortical; 11 et 12, tubule collecteur médullaire externe (parties externe et interne); 13 à 15, tubule collecteur médullaire interne (divisé en 3 zones égales).

La formation de l'urine s'effectue en deux temps : tout d'abord, dans le réseau de capillaires glomérulaires s'effectue la filtration du sang grâce à un mécanisme de semi-perméabilité au cours duquel les grosses molécules sont retenues. Chez l'homme, cent quatre-vingt litres de filtrat sont ainsi formés chaque jour et déversés dans les tubules. Ce filtrat, dont la composition est initialement équivalente au plasma privé des grosses molécules (et donc isoosmotique), est continuellement modifié au cours de son passage le long des tubules depuis le tubule proximal jusqu'à la fin du tubule collecteur. La très grande majorité du fluide et des solutés est réabsorbée et l'excrétion finale d'urine (ou diurèse) n'est que de 1 à 3 litres par jour en moyenne (Guyton and Hall, 1996)

1.4.3 La dilution des urines

Le mécanisme de dilution des urines permet d'évacuer le surplus d'eau contenu dans l'organisme (Bankir *et al.*, 1989 ; DeRouffignac et Bankir, 1990 ; Knepper and Rector, 1992). Cette dilution est réalisée grâce à la réabsorption active du NaCl dans la portion large de la branche ascendante de l'anse de Henlé. Cette réabsorption est basée sur des pompes Na^+/K^+ /ATPases, situées à la partie basolatérale des cellules tubulaires, et sur des échangeurs $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ situés à leur partie apicale. Le NaCl est puisé dans la lumière des tubules et déversé dans l'interstitium d'où il gagne rapidement les vaisseaux sanguins et retourne dans la circulation. La partie ascendante de l'anse étant imperméable à l'eau, les sels qui passent dans l'interstitium n'entraînent pas de molécules d'eau avec eux, et le liquide de la branche ascendante se dilue petit à petit. C'est ainsi qu'à la sortie de l'anse se trouve un fluide hypotonique par rapport au "milieu intérieur". Ce liquide hypotonique ne sera pas réabsorbé, ou guère, dans les tubules collecteurs car en période de dilution des urines, l'ADH est absente et les tubules collecteurs sont imperméables à l'eau. Une urine diluée, c'est-à-dire contenant une quantité importante d'eau et peu de solutés, sera excrétée. Il est intéressant de constater que le phénomène-moteur de la dilution des urines, à savoir la réabsorption du NaCl dans la branche ascendante de l'anse de Henlé, est le même que celui qui sert à générer des urines concentrées.

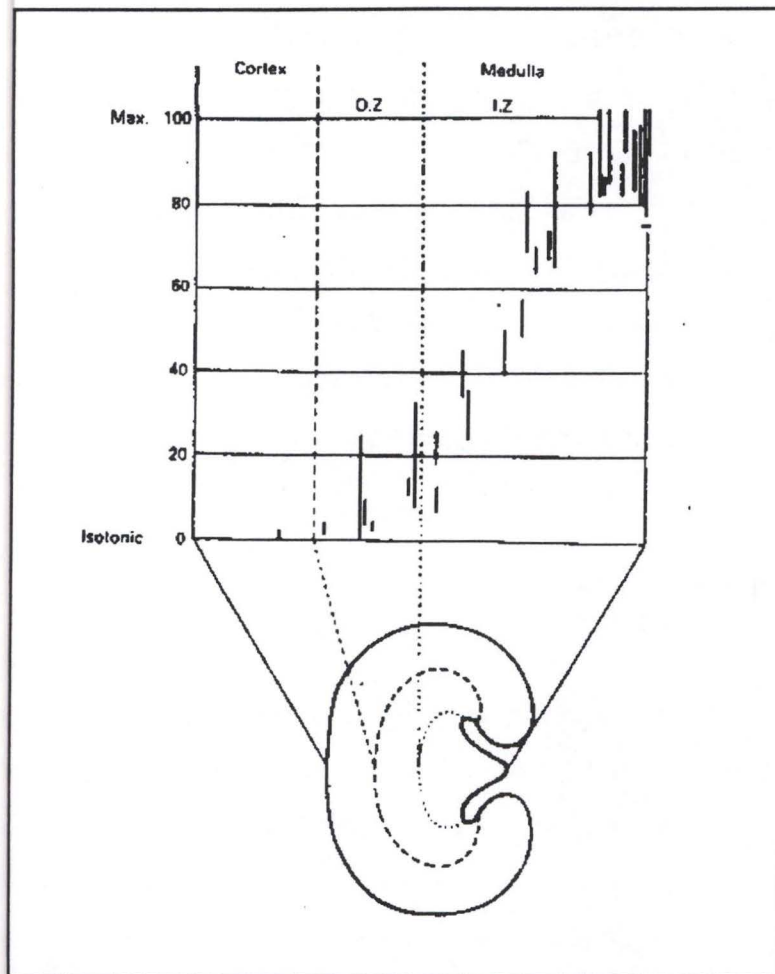


Fig. 1.6. Gradient cortico-papillaire d'osmolalité dans le rein d'un lapin déshydraté découpé en plusieurs tranches, selon Wirz et al., 1951 (cité par Knepper and Rector, 1992). Les osmolalités relatives, au-delà de la valeur isotonique, et jusqu'à l'osmolalité maximale (100%), sont indiquées en ordonnée ; les différentes tranches sont placées le long de l'axe horizontal.

1.4.4 La concentration des urines

Une façon de concentrer les urines serait de pomper de l'eau hors des tubules. Cette solution est visiblement impossible, aucune "pompe à eau" n'ayant été démontrée dans le règne animal. Ajouter des solutés à l'urine est également irréalisable, pour les raisons exposées au début de cette introduction. La solution à ce problème est un mouvement osmotique de l'eau hors des tubules grâce à un gradient d'osmolalité de part et d'autre de la paroi tubulaire. C'est dans la médullaire qu'est réalisé ce gradient (de Rouffignac et Bankir, 1990 ; Knepper and Rector, 1992).

En période de concentration urinaire, la médullaire est une zone hyperosmotique par rapport au plasma et par rapport au fluide tubulaire. La présence d'une médullaire, et en particulier d'une anse de Henlé qui prend la forme d'une épingle à cheveux, est la condition indispensable pour concentrer les urines. Cette anse de Henlé s'enfonce dans la profondeur du rein. Elle est présente chez 15% des néphrons des oiseaux et dans tous les néphrons des mammifères (Bankir and DeRouffignac, 1985). Chez les mammifères, deux types d'anses existent : les anses courtes, qui "tournent" dans la médullaire externe et les anses longues qui descendent jusque dans la médullaire interne (cfr Fig.1.5).

Si la présence d'une anse de Henlé conditionne le mécanisme de concentration des urines, c'est parce qu'elle s'accompagne d'un autre phénomène : une accumulation de solutés dans la médullaire. Comme l'avaient fait remarquer en 1951 Wirz *et al.* cités par Knepper and Rector (1992) il existe, en période de concentration urinaire, un gradient d'osmolalité du cortex vers la médullaire (Fig. 1.6). Les solutés qui s'accumulent dans la médullaire sont essentiellement le sodium, le chlore et l'urée (Knepper and Rector, 1992). Chez l'animal privé d'eau, le potassium aussi est plus concentré dans la médullaire que dans le cortex. Les concentrations de solutés sont isotoniques au niveau du cortex, augmentent sensiblement au niveau de la médullaire externe puis de manière très importante dans la médullaire interne. La concentration des urines s'effectue dans les tubules collecteurs qui traversent cette région hypertonique du rein.

Le mécanisme qui est à la base de ce gradient cortico-médullaire est appelé “ multiplication par contre-courant ”. Les premières étapes sont les mêmes que lors de la dilution des urines. Le NaCl est extrait, sans eau, de la branche ascendante de l'anse de Henlé dans la médullaire. Mais ce NaCl reste maintenant “ bloqué ” dans l'interstitium. Là, il “ attire ” l'eau de la branche descendante de l'anse, car la paroi de celle-ci est toujours perméable à l'eau. Le liquide de la branche descendante se concentre donc au fur et à mesure de sa descente vers la papille. De plus, les tubules collecteurs cheminant le long de l'anse de Henlé sont devenus perméables à l'eau car l'ADH est présent en condition d'antidiurèse. Là aussi se réalise un équilibre osmotique du fluide tubulaire avec l'interstitium plus concentré. Une urine plus concentrée pourra être excrétée. Pour que les mécanismes de concentration urinaire fonctionnent bien, il est important que le débit dans les tubules collecteurs soit inférieur au débit au niveau de l'anse de Henlé pour éviter l'épuisement du gradient. C'est effectivement ce qui se passe, car une majorité de l'eau est déjà réabsorbée au niveau des tubules collecteurs du cortex. Rappelons que le fluide à la sortie de l'anse de Henlé est hypotonique par rapport à l'interstitium cortical.

En résumé, lors d'une concentration urinaire, l'hypertonie accumulée dans l'interstitium au niveau de la boucle de l'anse est “ transférée ” dans l'urine sortante par le mouvement osmotique des molécules d'eau en sens inverse, c'est-à-dire de la lumière des tubules collecteurs vers l'interstitium. L'urine sortante est donc concentrée.

1.4.5 L'hormone antidiurétique

Cette hormone, d'origine neuro-hypophysaire, a pour effet d'augmenter la perméabilité hydrique au niveau de la paroi des tubules collecteurs en insérant des canaux hydriques dans la membrane apicale des cellules (Hays, 1992). L'ADH se fixe sur des récepteurs V2 couplés à la protéine G_s , ce qui active l'adénylate cyclase et produit une quantité importante d'AMP cyclique. Cet AMPc active la protéine kinase A (PKA) qui a pour rôle de phosphoryler certaines protéines (encore peu connues). La cellule répond en envoyant vers la membrane apicale des vésicules contenant au niveau de leur membrane des protéines spécifiques servant de canaux hydriques. Ces protéines sont appelées aquaporines-2 (Benoit *et al.*, 1996). L'eau présente dans la lumière tubulaire entre alors dans les cellules

de la paroi tubulaire, via ces aquaporines, en suivant le gradient d'osmolalité. L'eau contenue dans la cellule passe ensuite vers l'interstitium, via d'autres aquaporines présentes dans la membrane basolatérale des cellules et insensibles à l'ADH. Lorsque l'ADH disparaît, les aquaporines-2 retournent par endocytose vers le cytoplasme.

A côté de cette action principale sur la perméabilité hydrique des tubules collecteurs, l'ADH possède aussi d'autres actions rénales dont certaines pourraient participer à la concentration des urines (Knepper and Rector, 1992) :

- L'ADH augmente la perméabilité à l'urée des tubules collecteurs mais cela uniquement dans la médullaire interne. La participation de l'urée à la concentration des urines est complexe et ne sera pas détaillée ici.
- L'ADH diminue le débit sanguin dans la médullaire externe et interne. Ceci est important pour empêcher une fuite trop rapide des solutés de l'interstitium hyperosmolaire.
- Enfin, il est possible que l'ADH ait une action sur la matrice extracellulaire de la médullaire ou sur les cellules de l'interstitium (Ginetzinsky, 1958 ; Hughes et al., 1995).

1.5 L'interstitium rénal

1.5.1 Description générale

L'interstitium rénal est un espace complexe comprenant des fluides, des microfibrilles, de la matrice extracellulaire et des cellules interstitielles (Dobyan and Jamison, 1984 ; Jamison and Gehrig, 1992 ; Kaissling *et al.*, 1996). Un passage à travers ce milieu extracellulaire est obligatoire pour toutes les substances passant des tubules au sang et inversement. Les cellules présentes dans ce milieu, non seulement participent à l'organisation de cette matrice extracellulaire, mais jouent également un rôle important dans la production d'éléments régulateurs, par exemple l'érythropoïétine qui stimule la production de globules rouges, et dans les processus immuns.

L'interstitium rénal est limité par la membrane basale des cellules tubulaires, des cellules composant les corpuscules, des cellules de l'épithélium pelvien et des cellules des vaisseaux sanguins. Les constituants cellulaires de cet interstitium sont des fibroblastes, qui

forment la trame pour les tubules et les vaisseaux sanguins, et qui maintiennent l'architecture tridimensionnelle du tissu rénal. On trouve également des cellules du système immunitaire. Entre ces cellules, se trouve la matrice extracellulaire proprement dite, formée de protéoglycans, de glycoprotéines, de fibrilles et de fluide interstitiel.

1.5.2 L'interstitium médullaire

1.5.2.1 *Circulation sanguine dans la médullaire*

L'interstitium est en équilibre avec le plasma qui y circule. Dans la médullaire, ce plasma provient de vaisseaux très perméables, les vasa recta, qui ont une disposition particulière : lorsque l'artériole efférente sort du glomérule, elle plonge dans la zone externe de la médullaire externe; dans cette partie, elle a toujours la capacité de vasoconstriction. Dans la médullaire externe, cette artériole se divise en 20 à 30 petits vaisseaux que l'on appelle vasa recta descendants. Ces vasa recta sont entourés de péricytes, cellules qui rappellent des cellules musculaires lisses, mais beaucoup plus éparses. Les vasa recta ont perdu leur capacité de vasoconstriction. Parfois, ils donnent naissance à un plexus de capillaires.

Lorsque les vasa recta descendent dans la médullaire interne, leur paroi endothéliale s'amincit et devient fenestrée. De façon souvent floue, les vasa recta descendants se "transforment" en vasa recta ascendants qui réabsorbent le liquide interstitiel en excès et conduisent le sang de la médullaire vers le cortex. Les vasa recta ascendants ramènent dans la circulation générale l'ensemble des substances réabsorbées dans les tubules.

Les vasa recta ne sont pas arrangés de manière aléatoire parmi les tubules mais sont rassemblés en paquets de vaisseaux hautement organisés. Ces paquets contiennent des vasa recta descendants et ascendants. Il est possible que la présence en quantités variables d'acide hyaluronique modifie le comportement des vasa recta, mais ces phénomènes restent encore assez obscurs (McPhee, 1998).

1.5.2.2 *Importance de l'espace interstitiel médullaire*

Au fur et à mesure que l'on s'enfonce dans le rein vers la pointe de la papille, l'interstitium représente une part de plus en plus importante du volume tissulaire. Ainsi, dans la bande externe de la médullaire externe ("*outer stripe of the outer medulla*"), l'espace interstitiel est clairsemé et ne représente que 5% du volume (Dobyan and Jamison, 1984). Par contre, dans la région plus interne de la médullaire externe ("*inner stripe of the outer medulla*") l'interstitium occupe 10 à 20% du volume total. Enfin, c'est dans la médullaire interne que cet interstitium est le plus important, occupant 20 à 30 % du volume (Knepper *et al.*, 1977 ; McPhee, 1998). L'intensité des échanges qui s'effectuent entre les vaisseaux et les tubules est, probablement, inversement proportionnelle au volume de l'interstitium (Knepper and Rector, 1992).

1.5.2.3 *Composition de l'interstitium*

Celui-ci est constitué d'une matrice gélatineuse riche en glycosaminoglycans dont le plus important est l'acide hyaluronique (Castor and Greene, 1968). L'acide hyaluronique constitue 96% des glycosaminoglycans sécrétés par des tranches de papille de rat *in vitro* (Pitcock *et al.*, 1988). L'interstitium médullaire contient, en outre, une population unique de cellules interstitielles allongées perpendiculairement aux tubules et aux vaisseaux (Kaissling *et al.*, 1996). Ces cellules s'accrochent par de longues excroissances cytoplasmiques à la membrane basale des cellules endothéliales d'une part et des cellules tubulaires (tubule collecteur et portion grêle de l'anse de Henlé) d'autre part. Cette organisation donne l'image d'une échelle dont les montants sont formés par les vaisseaux et les tubules, et les échelons par ces cellules interstitielles allongées.

1.5.2.4 *Caractéristiques des cellules interstitielles*

On pense que les fibrocytes subissent des variations de phénotype en passant de la médullaire externe à la médullaire interne (Kaissling *et al.*, 1996). Dans la couche externe, les fibroblastes sont semblables à ceux présents dans l'interstitium pérítubulaire du cortex. Dans la partie plus interne, les fibres du cytosquelette, filaments d'actine et filaments

intermédiaires, prennent de plus en plus d'importance, essentiellement sous la membrane du péricaryon et au sein des excroissances cytoplasmiques. En s'enfonçant dans la médullaire, ces cellules présentent également des changements graduels au niveau du réticulum endoplasmique, dont les citernes s'élargissent et se remplissent d'un matériel floconneux. On ne connaît pas encore la signification de ces observations. Cependant, la question de savoir si une accumulation d'acide hyaluronique, peut-être au départ des cellules interstitielles, ralentit ou augmente la réabsorption hydrique, n'est pas tranchée. Certains ont même proposé qu'un excès d'acide hyaluronique dans la médullaire interne serait responsable de l'hypertension observée chez les animaux ou individus obèses (Hall *et al.*, 1996) Enfin, ces cellules, en particulier dans la médullaire interne, sont caractérisées par un nombre variable de gouttelettes lipidiques (Kaissling *et al.*, 1996)

Entre ces cellules interstitielles sont présentes des " gap junctions " de taille et de forme variables et des " tight junctions ". Ces différentes jonctions aideraient au maintien, au sein de la médullaire, de l'organisation en échelle citée précédemment.

1.5.2.5 *Fonction des cellules interstitielles*

De multiples fonctions ont été proposées pour les cellules interstitielles de la médullaire :

- elles servent de support pour les vaisseaux et tubules;
- elles divisent l'interstitium en microcompartiments et pourraient donc limiter les diffusions axiales à l'intérieur de la médullaire interne;
- elles élaborent la matrice extracellulaire en produisant une quantité abondante d'acide hyaluronique (Pitcock *et al.*, 1988);
- elles sont contractiles (Hughes *et al.*, 1995);
- elles synthétisent des prostaglandines (Thomas *et al.*, 1996);
- de nombreuses gouttelettes lipidiques pourraient stocker des lipides vaso-dépressifs qui influencent la pression sanguine (Muirhead, 1991 ; Thomas *et al.*, 1996). Par cette voie, les cellules de l'interstitium médullaire pourraient participer à la réduction de la pression artérielle dans certaines circonstances.

Les cellules de l'interstitium pourraient aussi jouer un rôle dans la régulation de l'osmolalité urinaire. Plusieurs mécanismes ont été suggéré dans cette optique :

- Par leur arrangement perpendiculaire aux axes dans la papille, les cellules interstitielles médullaires constituent une barrière à la dissipation du gradient osmotique crée dans cet interstitium.
- Par des phénomènes de contraction et relâchement, ces cellules pourraient influencer le volume de l'interstitium
- Par leur sécrétions d'acide hyaluronique, ces cellules pourraient modifier la texture de l'interstitium médullaire, et par là ses propriétés de perméabilité hydrique et/ou de pression osmotique (McPhee, 1988).

1.6 Buts du travail

Le but de ce travail a été d'étudier l'effet de conditions physiologiques d'hydratation et de déshydratation sur la transcription des gènes de l'hyaluronidase et de l'hyaluronan-synthase chez le rat. A cette fin, l'approche de la PCR compétitive a été retenue puisqu'elle permet l'étude de messagers peu exprimés. Cette technique a été effectuée sur l'ADN complémentaire des médullaires internes (comprenant la papille), médullaires externes et cortex de différents rats hydratés et déshydratés, mélangé à celui d'un plasmide compétiteur construit.

En raison de certains problèmes, la technique de PCR compétitive a dû être remplacée par la technique de PCR "semi-quantitative" dans le but de déceler un changement dans l'expression des gènes de l'hyaluronidase et de l'hyaluronan-synthase dans les mêmes conditions physiologiques. Nous avons également effectué ces mêmes mesures au départ de cellules interstitielles et tubulaires de la médullaire interne en cultures primaires.

2 Matériel et Méthodes

2.1 Préparation des rats

En vue de tester l'effet de l'hydratation et de la déshydratation, douze rats SPRAGUE-DAWLEY mâles pesant environ 200 g ont été soumis à un régime spécial pendant 72 heures, de manière à ce que la population d'animaux traités soit homogène. Six rats ont été hydratés, et six rats ont été déshydratés.

2.1.1 Hydratation des rats

Comme les rats de laboratoire n'absorbent spontanément que très peu de liquides, il est nécessaire de les "forcer" à ingérer plus d'eau que d'habitude. Pour cela, leur nourriture habituelle ("rat chow", Carpil) est mélangée à un grand volume d'eau et transformée en un "gâteau" au moyen d'agar. Les rats adorent ce genre de présentation et consomment la quantité totale des cubes de gâteau qui leur est offerte chaque jour, pour autant que la quantité de nourriture solide qui y est incluse ne dépasse pas 20 g par jour pour un rat d'environ 200 g.

Le gâteau se compose de

- 144 g de nourriture en poudre
- 5,76 g d'agar
- 576 ml d'eau du robinet

Il est réalisé de la façon suivante :

- mettre l'agar dans l'eau froide
- porter à ébullition
- au premier bouillon, ajouter la nourriture en poudre

Par jour, chaque rat absorbe 100 g de gâteau correspondant à 20 g de nourriture et à 70 à 75 ml d'eau (il y a un peu d'évaporation lors de la préparation).

2.1.2 Déshydratation des rats

Les rats soumis à un régime de déshydratation ont reçu pendant les 24 premières heures 10 ml d'eau et 20 g de nourriture solide. Les 48 heures suivantes, les rats ont été privés d'eau et ont consommé de la nourriture solide à volonté. Ils absorbent par jour de 15 à 20 g de nourriture solide.

2.1.3 Traitement des instruments pour la préparation d'ARN

Les rats hydratés et déshydratés sont sacrifiés dans le but de préparer de l'ARN extrait de leurs reins. Pour cette extraction, il faut veiller à utiliser du matériel sans RNases, enzymes que l'on trouve sur la peau du manipulateur et sur tous les objets touchés par celui-ci. Il est d'ailleurs nécessaire que le manipulateur porte des gants pour ne pas contaminer les instruments avec des RNases.

Dans notre cas, les instruments ont été rendus "RNase free" par un traitement au diéthylpyrocarbonate (DEPC) en solution à 2 pour 1000 dans de l'eau RQ (H₂O milliQ de Millipore). Ils ont ensuite été autoclavés de manière à détruire le DEPC qui est un inhibiteur des réactions enzymatiques. Le DEPC est actif pendant environ deux heures. Ainsi les instruments sont laissés 2 heures dans cette eau DEPC, puis séchés et autoclavés.

L'eau utilisée pour des réactions en présence d'ARN est de l'eau DEPC, c'est-à-dire de l'eau RQ contenant du DEPC à 2 pour 1000, laissée deux heures à température ambiante puis autoclavée.

2.1.4 Prélèvement des fragments de rein

La veille du sacrifice, les rats sont placés dans des cages métaboliques traitées au Silane. Ces cages permettent de récolter les urines de 24 heures de façon assez précise sous une couche d'huile qui évite l'évaporation. L'osmolalité urinaire est mesurée au moyen d'un osmomètre (Fiske) qui mesure l'abaissement du point de congélation. Le matin du dernier jour, les rats sont sacrifiés par décapitation après une brève anesthésie à l'éther. Les reins sont rapidement prélevés en évitant toute contamination par les RNases. En deux à trois minutes maximum, sur une plaque glacée, la médullaire interne y compris la papille est ôtée

en entier, ainsi que la médullaire externe et un fragment du cortex. Les fragments de tissu de même nature qui proviennent du même animal sont rassemblés. Ces fragments sont en fait immédiatement plongés dans de l'azote liquide et conservé à -80°C jusqu'à l'extraction de l'ARN.

2.2 Méthodes relatives à l'ARN

2.2.1 Extraction d'ARN total

Dans le cadre de ce travail, plusieurs techniques ont été essayées. L'extraction avec le réactif TRIzol n'ont pas donné de résultats satisfaisants car l'ARN semblait fort dégradé. Par contre, les deux kits Qiagen utilisés ont donné de meilleurs résultats et ont été utilisé pour l'ensemble des données présentées dans ce travail.

2.2.1.1 RNeasy mini Kit (Qiagen)

Ce kit permet d'extraire l'ARN total d'une petite quantité de tissu (de 0.5 mg à 30 mg) ou de cellules.

2.2.1.1.1 Solutions utilisées

Les tampons RLT, RW1 et RPE sont fournis avec le kit.

2.2.1.1.2 Protocole pour les tissus

- placer le tissu dans du tampon RLT : 350 μl pour moins de 20 mg de tissu et 600 μl pour 20 à 30 mg de tissu, (c'est généralement ce second volume qui a été utilisé lors de nos expériences)
- ajouter 1/100 de volume de β -mercaptoéthanol
- homogénéiser dans un potter
- centrifuger 3 minutes (Microfuge)
- ajouter 1 volume d'éthanol 70 % DEPC

- mélanger en pipetant
- mettre 700 μ l de l'échantillon sur la colonne fournie avec le kit, laquelle est placée sur un eppendorf de 2 ml
- centrifuger 15 secondes à 8000 \times g
- enlever soigneusement l'éluat et le jeter
- répéter cette opération tant qu'il reste de l'échantillon
- ajouter 700 μ l de Tampon RW1 sur la colonne pour la laver
- centrifuger 15 secondes à 8000 \times g et jeter l'éluat
- transférer la colonne sur un nouveau tube de 2 ml
- ajouter 500 μ l de tampon RPE sur la colonne pour la laver
- centrifuger 15 secondes à 8000 \times g et jeter l'éluat
- ajouter à nouveau 500 μ l de tampon RPE sur la colonne pour la laver
- centrifuger 2 minutes à vitesse maximale pour sécher la colonne
- transférer la colonne sur un nouvel eppendorf de 1,5 ml
- ajouter avec 30 à 50 μ l d'eau DEPC
- centrifuger 1 minute à 8000 \times g et garder l'éluat qui contient l'ARN total
- répéter l'éluat une deuxième fois afin d'augmenter la quantité d'ARN récupérée
- stocker l'ARN à -80°C
-

2.2.1.1.3 Protocole pour les cellules

- lyser la monocouche de cellules cultivées sur une boîte de 9 cm de diamètre avec 600 μ l de Tampon RLT.
- récolter le lysat avec un "grattoir pour cellules"
- passer ce lysat 5 fois au travers d'une aiguille de 0,9 mm de diamètre pour l'homogénéiser
- ajouter un volume d'éthanol 70% et mélanger en pipetant
- passer le lysat sur la colonne Qiagen (700 μ l maximum)

La suite des événements est la même que celle décrite précédemment pour les tissus.

2.2.1.2 *Extraction par RNeasy midi Kit (Qiagen)*

Ce kit permet d'extraire l'ARN total à partir de 20 mg à 250 mg de tissu. Il a été utilisée pour extraire l'ARN des fragments de cortex.

- placer le tissu dans 1,9 ml de tampon RLT (ceci est valable pour des tissus de 20 à 130 mg)
- ajouter 1/100 de volume de β -mercaptoéthanol
- homogénéiser
- centrifuger 5 minutes à 5000 \times g
- récupérer le surnageant sans prendre la couche grasseuse entourant le culot
- ajouter 1 volume d'éthanol 70 % DEPC
- mélanger en vortexant 5 secondes
- passer l'échantillon sur la colonne en plusieurs étapes puisque le volume maximal de la colonne est de 3,8 ml.
- centrifuger 5 minutes à 5000 \times g et jeter l'éluat
- ajouter 3,8 ml du tampon RW1 sur la colonne pour la laver
- centrifuger 5 minutes à 5000 \times g g et jeter l'éluat
- ajouter 2,5 ml de tampon RPE pour laver la colonne
- centrifuger 2 minutes à 5000 \times g g et jeter l'éluat
- ajouter à nouveau 2,5 ml de tampon RPE
- centrifuger 5 minutes pour sécher la colonne
- déposer 150 μ l d'eau DEPC sur la colonne
- centrifuger 3 minutes et garder l'éluat qui contient l'ARN total
- répéter l'élution une deuxième fois
- stocker l'ARN à -80°C
-

2.2.2 **Quantification de l'ARN**

La concentration en ARN en solution aqueuse est déterminée par une mesure de densité optique (D.O.) lue à 260 nm. Une unité de D.O. correspond à 40 μ g d'ARN par ml. La lecture s'effectue dans une cuvette de 100 μ l dans laquelle se trouvent 98 μ l d'eau DEPC et 2 μ l de la préparation d'ARN.

2.2.3 Electrophorèse sur gel d'agarose

Cette technique permet de visualiser les différents ARN et d'observer une éventuelle dégradation de celui-ci. Deux bandes majeures apparaissent : la bande de haut poids moléculaire correspond à l'ARN 28S, et l'autre correspond à l'ARN 18S. La première doit être de plus forte intensité que la seconde. Dans le cas contraire, c'est un signe de dégradation. La présence d'un "smear" ou d'autres bandes nettes est également le signe d'une dégradation de l'ARN.

2.2.3.1 Solutions utilisées

MOPS 10 × :

200 mM MOPS (acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique)

50 mM NaAc

10 mM EDTA

Mettre à pH 7 avec du NaOH 10M

2.2.3.2 Préparation des échantillons

Selon l'estimation de la concentration d'ARN par D.O., une certaine quantité d'ARN est prélevée pour chaque échantillon. Une solution "alourdissante" et dénaturante de MOPS 1 ×, formaldéhyde 6,4 %, formamide 50 %, glycérol 6% et de bleu de bromophénol 0,05 % est préparée.

Pour 1 volume de solution d'ARN, 4 volumes de ce mélange ont été ajoutés.

Les échantillons ont été chauffés pendant 10 minutes à 65°C pour les dénaturer, ensuite ils sont gardés sur glace et brièvement centrifugés dans une microfuge avant d'être chargés sur le gel.

2.2.3.3 Préparation du gel non dénaturant

Pour un gel de 11x14 cm et contenant 1.2% d'agarose :

- porter à ébullition 1,2 g d'agarose dans 72 ml d'eau DEPC

- laisser refroidir jusqu'à environ 60°C
- ajouter 10 ml de MOPS 10 ×
- ajouter 18 ml de formaldéhyde 37 %
- ajouter 2 µl de bromure d'éthidium pour 100 ml de solution de gel
- couler le gel

Le tampon de migration est du MOPS 1 × qui contient 1 µl de bromure d'éthidium pour 100 ml.

2.2.3.4 *Migration*

Les échantillons déposés dans les puits migrent sous électrophorèse à 80 volts pendant environ 3 heures.

2.2.4 **Préparation d'ADNc par transcription réverse**

Cette étape a pour but de convertir l'ARN en ADN complémentaire (ADNc) grâce à la transcriptase réverse, une enzyme d'origine virale. L'ADNc ainsi obtenu a une séquence différente de celle de l'ADN génomique puisque l'ADNc ne contient que les exons du gène, les introns ayant été excisés lors de la transcription de l'ADN en ARNm.

2.2.4.1 *Traitement préalable à la DNase*

Afin d'éviter la contamination de l'ADNc par de l'ADN génomique, il est nécessaire de dégrader celui-ci avant de faire agir la transcriptase reverse.

2.2.4.1.1 **Solutions utilisées**

Il s'agit de la DNase I "Amplification Grade" (Gibco BRL) qui est "RNase free". Le tampon de réaction 10x est du 200 mM Tris-HCl pH 8.4, 20 mM MgCl₂ et 500 mM KCl. Une solution de EDTA 25 mM est fournie avec l'enzyme de manière à arrêter la réaction enzymatique.

2.2.4.1.2 Protocole

Placer dans un eppendorf :

- 2 μg d'ARN total
- 1 μl de tampon DNase 10 \times
- 1 unité de DNase I
- ajouter de l'eau DEPC pour atteindre un volume de 10 μl

Laisser 30 minutes à température ambiante, puis ajouter 1 μl d'EDTA 20 mM.

Chauffer les échantillons 10 minutes à 70°C pour dénaturer l'enzyme, puis poser sur glace.

2.2.4.2 *La réaction de transcription reverse*

2.2.4.2.1 Solutions utilisées

Le transcriptase réverse provient de la firme Gibco BRL (SuperScript II), elle est fournie son tampon et du DTT (dithiothréitol). La solution d'hexamères aléatoires (Boeringher Mannheim) est à 312 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et sera utilisée diluée 10 \times .

2.2.4.2.2 Protocole

Mélanger :

- 4 μl de tampon 5 \times
- 2 μl de DTT 100 mM
- 1 μl d'hexamères aléatoires dilué 10 \times
- 1 μl d'un mélange de dNTPs 10 mM chacun
- 1 μl de SuperScript II 200 U/ μl

Ajouter sans attendre ces 9 μl aux 11 μl de solution aqueuse contenant 2 μg d'ARN total, placés dans des tubes gardés sur glace.

Incuber 30 minutes à 37°C, puis 30 minutes à 42°C pour la réaction enzymatique et enfin 5 minutes à 95°C pour dénaturer le transcriptase.

Les ADNc synthétisés sont stockés à -20°C.

2.2.4.3 *Contrôle de qualité des ADNc synthétisés par PCR*

Pour s'assurer que la transcription réverse s'est réalisée correctement, les ADNc ont été testés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) avec des amorces qui amplifient l'ADNc de la GAPDH (glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase). Ces oligonucléotides sont appelés GAPDH SD 5' et GAPDH SD 3', et leurs séquences sont les suivantes :

GAPDH SD 5' 5'-ATC-ACT-GCC-ACT-CAG-AAG-AC-3'

GAPDH SD 3' 5'-TCA-TTG-AGA-GCA-ATG-CCA-GC-3'

Les conditions de PCR étaient les suivantes :

94	94	55	72	72	4°C
4'	1'30''	1'30''	1'30''	7'	over
30 cycles					

La présence d'une bande d'amplification de la taille attendue sur gel d'agarose indique que l'ADNc produit est probablement de bonne qualité.

2.3 *Méthodes relatives à l'ADN*

2.3.1 *Milieu de culture pour les bactéries*

En culture liquide, on utilise le milieu LB (Luria-Bertani): bactotryptone (DIFCO) 10 g/l, bacto yeast extract (DIFCO) 5 g/l, NaCl 10 g/l, pH 7.4. Le milieu est stérilisé par un autoclavage de 20 minutes à 100°C. On y ajoute éventuellement l'antibiotique auquel les bactéries transformées par un plasmide donné doivent être résistantes, par exemple de l'ampicilline à une concentration finale de 50 µg/ml.

En culture semi-solide, sur boîte de Petri, on utilise du milieu LB auquel on ajoute 15 g/l de bacto-agar (DIFCO). Ce milieu est également stérilisé par autoclavage pendant 20 minutes à 100°C.

2.3.2 Mini-préparation d'ADN plasmidique

Cette technique permet d'extraire l'ADN plasmidique d'une culture de 5 ml de bactéries. Cette préparation s'effectue dans des eppendorfs de 1,5 ml.

2.3.2.1 Solutions utilisées

Les solutions utilisées sont celles fournies avec le kit Nucléobond de Macherey Nagel.

- Tampon S1: - Tris-HCl 50 mM
 - EDTA pH 8 10 mM
 - RNase 100 µg/ml (fournie avec le kit)
- Tampon S2 : - NaOH 200 mM
 - SDS 1 %
- Tampon S3 : - Acétate de potassium 3 M pH 5.1

2.3.2.2 Protocole

- inoculer 5 ml de milieu LB contenant l'antibiotique adéquat (par exemple, ampicilline à 50 µg/ml)
- faire pousser la mini-culture pendant une nuit à 37°C sous agitation (saturation)
- centrifuger 1,5 ml de culture pendant 5 minutes dans une centrifugeuse Janetzki à 13.000 rpm
- enlever le surnageant et ajouter 1,5 ml de culture sur le culot de bactéries
- centrifuger 5 minutes dans les mêmes conditions
- enlever le surnageant et resuspendre le culot dans 300 µl de tampon S1 + RNase froid
- ajouter 300 µl de tampon S2 (température ambiante) et inverser une fois
- laisser 5 minutes à température ambiante
- ajouter 300 µl de tampon S3 froid
- laisser 5 minutes sur glace
- centrifuger 15 minutes à froid
- récupérer le surnageant dans un autre eppendorf
- précipiter l'ADN plasmidique en ajoutant 700 µl d'isopropanol

- centrifuger 15 minutes à froid
- enlever délicatement le surnageant et laver le culot avec 100 µl d'éthanol 70%
- centrifuger 10 minutes à froid
- enlever le surnageant et sécher le culot sous vide au Speed-Vac (Savant)
- resuspendre le culot dans 20 µl d'eau RQ stérile

2.3.3 Midi-préparation d'ADN plasmidique

Cette préparation a été réalisée en utilisant le kit Nucléobond AX 100 (Macherey Nagel).

2.3.3.1 Solutions utilisées

Les solutions S1, S2, S3 sont les mêmes que celles utilisées pour la minipréparation d'ADN. Trois tampons supplémentaires fournis par le kit sont utilisés pour les colonnes du kit :

- Tampon N2: - Tris 100 mM
 - Ethanol 15 %
 - KCl 900 mM ajusté à pH 6.3 avec de l'H₃PO₄ dilué
- Tampon N3 : - Tris 100 mM
 - Ethanol 15 %
 - KCl 1150 mM ajusté à pH 6.3 avec H₃PO₄
- Tampon N5 : - Tris 100 mM
 - Ethanol 15%
 - KCl 1000 mM ajusté à pH 8.5 avec H₃PO₄

2.3.3.2 Protocole

- inoculer 200 ml de milieu LB + ampicilline avec une préculture de 5 ml
- incuber avec agitation à 37°C pendant une nuit
- centrifuger les 200 ml de culture à 5.000 rpm, 5 minutes à 4°C (centrifugeuse Beckman J21B, rotor JA14)
- enlever le surnageant et resuspendre le culot dans 4 ml de tampon S1 + RNase froid

- ajouter 4 ml de tampon S2 et mélanger doucement en inversant une fois
- laisser 5 minutes à température ambiante
- ajouter 4 ml de tampon S3 et inverser 6 à 8 fois
- laisser 10 minutes sur glace
- centrifuger 30 minutes à 12.000 rpm dans le rotor JA20
- reprendre le surnageant et centrifuger à nouveau 15 minutes dans les mêmes conditions
- équilibrer une colonne AX 100 avec 2 ml de tampon N2
- passer le surnageant sur la colonne et jeter l'éluat
- laver la colonne avec 2 × 4 ml de tampon N3
- éluer l'ADN plasmidique avec 2 ml de tampon N5
- précipiter cet ADN avec 0,8 volume d'isopropanol
- centrifuger 30 minutes à 10.000 rpm
- enlever le surnageant et laver avec 1 ml d'éthanol 70%
- centrifuger 10 minutes à 10.000 rpm
- enlever le surnageant et sécher le culot sous vide
- resuspendre le culot dans 100 µl d'eau stérile ou de Tris 10mM-EDTA 1 mM (TE 10/1)

2.3.4 Bactéries compétentes

Pour transformer des bactéries, c'est-à-dire les forcer à "ingérer" de l'ADN exogène, il faut au préalable les traiter d'une certaine manière. On dit qu'on les rend compétentes. Deux méthodes différentes ont été utilisées selon le mode de transformation utilisé par la suite.

2.3.4.1 *Méthode au CaCl₂*

- à partir d'une colonie de DH11S (Gibco BRL) isolée sur milieu solide,ensemencer 10 ml de milieu LB et incuber une nuit à 37°C sous agitation
- mettre ces 10 ml dans 400 ml de milieu LB et incuber à 37°C jusqu'à ce que la culture atteigne une D.O. de 0,3
- placer la culture 10 minutes dans de la glace
- centrifuger 5 minutes à 5.000 rpm à 4°C (centrifugeuse Beckman, rotor JA14)

- resuspendre le culot dans du CaCl₂ 50 mM (la moitié du volume initial)
- laisser 20 minutes sur glace
- centrifuger 5 minutes à 5.000 rpm dans les mêmes conditions
- resuspendre le culot dans du CaCl₂ 50 mM + glycérol 15% (1/10 du volume initial)
- aliquoter par 200 µl et conserver à -80°C

2.3.4.2 *Bactéries électrocompétentes*

- à partir d'une colonie de DH11S isolée sur milieu LB solide, ensemercer 10 ml de milieu LB liquide et incuber une nuit à 37°C
- mettre ces 10 ml dans 400 ml de milieu LB et faire pousser à 37°C en agitant jusqu'à ce que la culture atteigne une D.O. de 0,5 à 0,8, puis la placer dans de la glace pendant 30 minutes
- centrifuger 15 minutes à 5000 rpm à 4°C (centrifugeuse Beckman, rotor JA14)
- enlever le surnageant et resuspendre le culot dans 400 ml d'eau RQ stérile (dans le même volume que le volume initial)
- centrifuger 15 minutes à 5.000 rpm dans les mêmes conditions
- resuspendre le culot dans 200 ml d'eau stérile (la moitié volume initial)
- centrifuger 15 minutes à 5.000 rpm dans les mêmes conditions
- resuspendre le culot dans du glycerol 10% froid (1/50 du volume initial)
- centrifuger 15 minutes à 5.000 rpm dans les mêmes conditions
- resuspendre le culot dans du glycérol 10% froid (1/400 du volume initial)
- aliquoter par 100 µl et conserver à - 80°C

2.3.5 Transformation d'ADN dans des bactéries

C'est une technique qui consiste à introduire un plasmide dans une bactérie. Deux techniques peuvent être utilisées : la transformation par choc thermique et l'électroporation.

La souche de bactéries utilisée est *E.coli* DH11S (Gibco BRL) et le vecteur est le pSK de la firme Promega.

2.3.5.1 Transformation par choc thermique

- ajouter 100 ng de plasmide ou 1/5 du volume du mélange de ligation (4 μ l) aux 200 μ l de bactéries rendues compétentes au CaCl_2
- laisser 40 minutes sur glace
- réaliser le choc thermique en plaçant le mélange 90 secondes à 42°C
- ajouter 1 ml de milieu LB
- incuber 30 minutes à 1 heure à 37°C
- étaler différents volumes sur des boîtes de pétri contenant le milieu LB + ampicilline, pour sélectionner les bactéries transformées

2.3.5.2 Electroporation

- ajouter 100 ng de plasmide ou 1/10 du volume du mélange de ligation (2 μ l) aux 100 μ l de bactéries rendues compétentes pour l'électroporation
- placer ce mélange dans une cuvette d'électroporation préalablement placée dans la glace
- réaliser le choc électrique à 2.300 Volts
- ajouter 1 ml de milieu LB
- incuber 1 heure à 37°C
- étaler différents volumes sur milieu LB solide + ampicilline, pour sélectionner les bactéries qui ont bien reçu le plasmide

2.3.6 Restriction d'ADN

La réaction de restriction consiste à couper l'ADN au moyen d'enzymes de restriction qui, en reconnaissant une séquence spécifique sur l'ADN double brin, le clivent à l'endroit reconnu. Certaines enzymes cliveront l'ADN double brin de manière symétrique : on parle de *bouts francs*, tandis que d'autres couperont de manière asymétrique : on parle alors de *bouts collants*

2.3.6.1 *Les tampons de restriction*

Les tampons utilisés sont ceux fournis avec les enzymes de restriction (Gibco BRL).

- Tampon 1 - Tris-HCl 50 mM, pH 8
- MgCl₂ 10 mM
- Tampon 2 : - Tris-HCl 50 mM, pH 8
- MgCl₂ 10 mM
- NaCl 50 mM
- Tampon 3 : - Tris- HCl 50 mM, pH 8
- MgCl₂ 10 mM
- NaCl 100 mM
- Tampon 4 : - Tris-HCl 20 mM, pH 7.4
- MgCl₂ 5 mM
- KCl 50 mM

2.3.6.2 *Les enzymes de restriction*

Les enzymes utilisées dans le cadre de ce travail sont :

- *EcoRI* Tp 3
- *EcoRV* Tp 2
- *HincII* Tp 4
- *KpnI* Tp 4
- *StyI* Tp 3
- *SstI* Tp 2

Pour les doubles restrictions, le tampon idéal a été choisi en fonction d'une table récapitulative indiquant le pourcentage d'activité de chaque enzyme dans les différents tampons.

2.3.6.3 *Protocole*

Dans un volume total de 30 µl, mettre en présence dans un même tube :

- 3 µl du tampon de restriction 10 × (compatible avec la ou les enzymes utilisées)
- 1 µg du plasmide à restreindre

- 1 à 2 μl de l'enzyme de restriction 10 U/ μl
- de l'eau RQ stérile pour porter le volume à 30 μl

Incuber 2 heures à 37°C.

2.3.7 La ligation d'ADN

Cette réaction vise à recréer la liaison phosphodiester entre l'extrémité 5' phosphate et l'extrémité 3' OH de chacun des deux ADN double brin que l'on veut liguer, c'est-à-dire entre le plasmide ouvert en un site de restriction et l'insert que l'on veut y placer. L'enzyme utilisée pour cette réaction est la T4 DNA ligase (Gibco BRL).

2.3.7.1 Tampon de ligation

La composition du tampon utilisé est la suivante :

- Tris 250 mM pH 7.6
- MgCl_2 50 mM
- DTT 5 mM
- ATP 5 mM
- PEG-8000 25%

2.3.7.2 Réaction de ligation

Dans un volume de 20 μl , mettre en présence dans un même tube :

4 μl de tampon de ligation 5×

2 μl de l'enzyme T4 DNA ligase 1U/ μl

une quantité x du plasmide linéarisé et déphosphorilé (environ 100 ng)

une quantité y d'insert

porter le volume à 20 μl avec de l'eau RQ stérile

incuber 2 heures à 37°C ou la nuit à 14°C

En théorie, on met en présence un même nombre de molécule d'insert et de plasmide.

2.3.8 Polymérisation

Cette réaction est effectuée au moyen de la T4 DNA polymérase ou parfois du fragment de Klenow. Ces enzymes, mises en présence d'un fragment d'ADN double brin restreint à bouts collants, ont la propriété d'ajouter des bases ou d'enlever les bases excédentaires pour mettre à bouts francs l'extrémité du fragment. En effet elles possèdent une activité polymérase 5' → 3' et une activité exonucléase 3' → 5'.

Cette étape permet de cloner à bouts francs quand les sites utilisés lors des restrictions (bouts collants) ne sont pas compatibles. Dans le cas de la T4 DNA polymérase, il est nécessaire d'utiliser un tampon précis ; par contre, dans le cas du fragment de Klenow, l'enzyme agit directement dans le tampon de restriction.

2.3.8.1 *Tampon de la T4 DNA polymérase*

Les conditions optimales pour la réaction enzymatique sont : Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 5 mM, BSA 50 µg/ml, dNTP de 1 à 100 µM et 10 unités d'enzymes pour 2 µg d'ADN.

2.3.8.2 *Réaction de polymérisation par la T4 DNA polymérase*

Dans un volume de 50 µl, mettre en présence :

les 30 µl d'ADN du mélange de restriction c'est-à-dire environ 1 µg d'ADN

1,2 µl de Tris HCl 2 M (concentration finale : 50 mM)

1 µl de chaque dNTP 100 mM (concentration finale : 2 mM chacun)

2 µl de T4 DNA polymérase 1 U/µl (Boeringher Mannheim)

0,2 µl de MgCl₂ 1 M (concentration finale : 5 mM)

porter à 50 µl avec de l'eau RQ stérile

Incuber 1 heure à 37°C.

2.3.8.3 Réaction avec la Klenow

Pour 30 μ l de réaction, placer dans un eppendorf :

- 20 μ l du mélange de restriction
- 1 μ l de dATP, dCTP, dGTP et dTTP (100 mM)
- 1 μ l du tampon de restriction
- 1 μ l du fragment de Klenow (Gibco BRL) 6U/ μ l
- 4 μ l d'eau RQ stérile

Incuber 1 heure à 37°C.

2.3.9 La déphosphorylation

Cette réaction consiste à enlever les phosphates en position 5' sur le plasmide linéarisé et mis à bouts francs, dans le but d'éviter que la matrice ne se referme sur elle-même. Cela permet ensuite d'effectuer la ligation de ce plasmide avec un insert non déphosphorylé. En effet, la liaison phosphodiester reste possible entre le phosphate 5' de l'insert et le groupement 3' OH de la matrice. Lors de la transformation dans *E.coli*, le deuxième lien phosphodiester se reformera par l'action d'enzymes de la bactérie.

2.3.9.1 Tampon de la phosphatase

L'enzyme utilisée est une phosphatase alcaline, la phosphatase d'intestin de veau (CIP, calf intestine phosphatase, Boeringher Mannheim). Le tampon de cette enzyme est fourni avec celle-ci.

Tampon 10 \times : Tris-HCl pH 8 200 mM
ZnCl₂ 10 mM
MgCl₂ 10 mM
0,5 mg/ml de BSA

2.3.9.2 Réaction de déphosphorylation

La réaction se fait en mélangeant, pour 30 μ l :

1 μ g de plasmide linéarisé

3 μ l du tampon phosphatase

2 μ l de CIP 1 U/ μ l

de l'eau RQ stérile pour arriver à 30 μ l

Incuber 1 heure à 37°C.

2.3.10 Extraction au phénol

Cette étape est réalisée dans le but d'éliminer les sels et les protéines de la solution dans laquelle se trouve l'ADN. Elle est utilisée par exemple dans le cas de la phosphatase, pour laquelle il est nécessaire, afin d'assurer son efficacité, d'enlever le tampon de restriction.

- porter le volume de la solution de laquelle on veut extraire l'ADN à 200 μ l avec de l'eau RQ stérile.
- ajouter 200 μ l de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1 en volume, stocké à 4°C)
- vortexer de 30 secondes à 1 minute
- centrifuger 10 minutes à 4°C
- récupérer la phase aqueuse dans laquelle se trouve l'ADN (éviter l'interface dans laquelle se trouve les protéines,...)
- précipiter à l'éthanol

2.3.11 Précipitation à l'éthanol

Cette étape suit directement l'extraction au phénol et permet de concentrer l'ADN.

- ajouter à la phase d'ADN 2,5 volume d'éthanol 100% et 1/10 de volume de NaAc 3M pH7
- incuber 10 minutes à -80°C
- centrifuger 20 minutes à froid
- enlever le surnageant et garder le culot

- ajouter 100 μ l d'éthanol 70 %
- centrifuger 8 minutes
- enlever l'éthanol 70 % et sécher le culot sous vide
- resuspendre le culot dans 20 μ l d'eau RQ stérile

2.3.12 Récupération de fragments d'ADN par GENE CLEAN (Biolabs)

Cette méthode permet de récupérer des fragments d'une taille supérieure à 400 pb. Toutes les solutions (NaI, New Wash,...) sont fournies avec le kit.

- après migration sur gel d'agarose, exciser la bande d'intérêt sous UV
- ajouter à ce morceau d'agarose, dans un eppendorf, trois volumes de NaI (c'est-à-dire par exemple 1,5 ml de NaI pour 0,5 g d'agarose)
- placer l'eppendorf pendant 10 minutes dans un bain à 50°C
- ajouter 5 μ l de " glassmilk " (billes de verre)
- laisser 5 minutes à température ambiante en agitant toutes les minutes
- centrifuger 10 secondes dans une microfuge (13.000 rpm)
- enlever le surnageant
- laver le culot en le resuspendant dans 700 μ l de Newwash, centrifuger 10 secondes dans la microfuge et enlever le surnageant
- répéter cette opération trois fois ; au dernier lavage, bien enlever la dernière goutte de surnageant
- éluer en resuspendant dans 5 μ l d'eau stérile ou de tampon TE 10/1
- incubé 5 minutes à 50°C
- centrifuger 2 minutes dans la microfuge
- récupérer le surnageant

L'élution en une étape permet de récupérer 80 % d'ADN ; on peut répéter l'élution pour récupérer 10 % d'ADN supplémentaire.

2.3.13 Récupération d'un petit fragment d'ADN par Nucleospin Extract (Macherey Nagel)

2.3.13.1 Les solutions utilisées

Les tampons NT1, NT2 et celui d'éluion NE sont fournis dans le kit et leurs compositions sont inconnues.

2.3.13.2 Protocole

- extraire la bande voulue sur agarose en minimisant le volume d'agarose
- ajouter 300 µl de tampon NT1 par 100 mg d'agarose
- incuber 10 minutes à 50°C, en vortexant toutes les 2 à 3 minutes
- déposer l'échantillon sur une colonne Nucleospin placée sur un eppendorf
- centrifuger 1 minute dans la microfuge (13.000 rpm)
- jeter l'éluat
- ajouter 700 µl de tampon NT3 sur la colonne
- centrifuger 1 minute dans la microfuge
- répéter cette étape de lavage au NT3
- jeter l'éluat
- centrifuger à nouveau pour sécher la colonne
- placer la colonne Nucléospin sur un nouvel eppendorf de 1,5 ml
- ajouter 50 µl de tampon d'éluion NE sur la colonne
- centrifuger 1 minute à 13.000 rpm et garder l'éluat qui contient l'ADN

2.3.14 Quantification d'ADN par spectrophotométrie

Cette technique est basée sur la propriété de l'ADN d'absorber à 260 nm. L'ADN dilué est placé dans une cuvette en quartz et le spectrophotomètre calcule la densité optique (D.O.) en se basant sur l'intensité du rayon lumineux incident et celle du rayon après absorption.

Sachant qu'une D.O. de 1 correspond à 50 µg d'ADN par ml et connaissant la dilution de l'ADN dans la cuvette, on peut en déduire la concentration.

Avant toute mesure, il est nécessaire d'effectuer un blanc, c'est-à-dire de mesurer la D.O. de la solution dans laquelle sera dilué l'ADN. Par la suite cette D.O. sera soustraite des D.O. des échantillons.

2.3.15 Migration d'ADN sur gel d'agarose.

Le gel d'agarose permet de séparer différents fragments d'ADN en fonction de leur taille. Le gel est soumis à un champ électrique d'environ 100 volts. L'ADN étant chargé négativement, il va migrer vers l'anode et ceci de manière inversement proportionnelle au logarithme de son poids moléculaire. Différentes concentrations en agarose sont utilisées selon les tailles à séparer : en augmentant le pourcentage en agarose, les fragments de petite taille peuvent être séparés, alors que les fragments de grande taille ne migreront quasiment pas. Les gels utilisés dans le cadre de ce mémoire vont de 1 % à 2 % d'agarose.

L'ADN est visualisé dans le gel grâce au bromure d'éthidium. Les molécules de bromure d'éthidium s'intercalent entre les bases de la double hélice et deviennent fluorescentes sous illumination U.V.

Pour estimer la taille des fragments d'ADN, un marqueur de taille est déposé sur le gel et subit la migration dans les mêmes conditions que les échantillons. Ce marqueur de taille est composé de différentes bandes dont la taille est connue. Deux marqueurs de taille ont été utilisés :

- Le lambda *Hind*III : ce marqueur correspond au génome du phage λ restreint par *Hind*III
- Le 100 pb DNA ladder (Gibco BRL)

2.3.15.1 Solutions utilisées

- La solution alourdissante (10 ×) :- Bleu de bromophénol 0,25 %
 - EDTA 25 mM
 - Glycérol 50 %

- eau RQ jusque 10 ml

- Le tampon de migration TAE 50 × :
 - 2 M Tris pH 7.2
 - 1 M NaAc
 - 50 mM EDTA
- bromure d'éthidium 10 mg/ml

2.3.15.2 *Réalisation du gel et dépôt des échantillons*

- mélanger la quantité adéquate d'agarose avec du tampon TAE 1 ×
- chauffer à ébullition
- laisser refroidir un peu le gel, ajouter 1 µl de bromure d'éthidium pour 100 ml de gel et le couler sur le portoir prévu à cet effet
- placer le(s) peigne(s) pour former les puits
- laisser polymériser le gel
- enlever les peignes et placer le gel dans la cuve remplie de tampon (TAE 1 ×)
- déposer les échantillons contenant la solution alourdissante dans les différents puits.
- appliquer le courant et laisser migrer environ 30 minutes
- après migration, visualiser les bandes d'ADN sur le banc UV

2.3.16 **Migration d'ADN sur gel de polyacrylamide**

Le gel de polyacrylamide permet également de séparer des fragments d'ADN en fonction de leur taille. Ce gel présente néanmoins quelques avantages par rapport au gel d'agarose :

- son pouvoir de résolution est tel qu'il peut séparer des molécules d'ADN dont la longueur ne diffère que de 0,2 % (par exemple, 1pb pour 500 pb)
- une plus grande quantité d'ADN peut être soumise à la migration sans perdre son pouvoir de résolution
- l'ADN prélevé de ce gel est extrêmement pur

2.3.16.1 *Les solutions utilisées*

TBE 5 × : 250 mM Tris
 250 mM acide borique
 5 mM EDTA pH 8

- Solution d'acrylamide 30 %
 - 29 g d'acrylamide (Biorad)
 - 1 g de N,N- méthylènebisacrylamide (Biorad)
 porter à 60 ml avec de l'eau RQ stérile
 chauffer quelques minutes à 37°C
 porter à 100 ml avec de l'eau RQ
- Solution alourdissante:
 - 25 mg de bleu de bromophénol
 - 25 mg de xylène cyanol
 - 5 ml de glycérol 87%
 porter à 10 ml avec du TBE 10 ×
- Persulfate d'ammonium
- EDTA 0,5 M pH 8
- Temed ou N,N,N',N'-Tétra-méthyl-éthylènediamine (Biolabs)
- Bain de bromure d'éthidium :
 - 2 µl de bromure à 10 mg/ml (concentration finale 0,5 µg/ml)
 - 40 ml de TBE 1 ×

2.3.16.2 *Composition du gel*

Pour 100 ml de gel :
 16,6 ml de la solution stock d'acrylamide 30 %
 62,7 ml d'eau RQ stérile
 20 ml de TBE 5 ×

Cette solution doit être stockée à 4°C et à l'obscurité car la lumière catalyse une réaction de désamination de l'acrylamide et empêcherait par la suite sa polymérisation.

Juste avant de couler le gel, ajouter :

le Temed (10 μ l pour 15 ml de gel) qui catalyse la réaction

le persulfate d'ammonium (100 μ l pour 15 ml de gel) qui est un accélérateur de la réaction

Quand ces deux réactifs sont ajoutés, le gel polymérise relativement vite.

2.3.16.3 *Protocole*

- Le gel est coulé entre deux plaques de verre séparées par des espaceurs et maintenues en place par un dispositif à vis de Biorad.
- Le dispositif est alors placé sur un portoir muni de languettes en caoutchouc pour assurer l'étanchéité.
- Un premier test d'étanchéité est effectué avec de l'eau, puis l'eau est enlevée et on attend que cela soit sec. Le gel est coulé juste après l'ajout du catalyseur et de l'accélérateur de réaction.
- Un peigne est placé en haut du gel pour former les puits nécessaires pour déposer les échantillons.
- Après environ une demi-heure, le gel est polymérisé.
- Avant de déposer les échantillons dans les puits, il est nécessaire de les vider du reste de gel non polymérisé, en raison de l'effet inhibiteur de l'oxygène en surface.
- Les échantillons sont préparés en ajoutant 1/10 de volume de solution puis ils sont déposés dans les puits.

Le tampon de migration utilisé est du TBE 1 \times . Les deux gels chargés sont placés sur un dispositif d'électrophorèse. La migration s'effectue à 80 V pendant une à deux heures en fonction de la taille des fragments d'ADN.

2.3.16.4 *Révélation du gel*

2.3.16.4.1 **Le bain de bromure d'éthidium**

Après migration, le gel est placé dans un bain de bromure d'éthidium durant 30 à 45 minutes puis les bandes d'ADN sont visualisées sur le banc UV.

2.3.16.4.2 **La radioactivité**

Dans le cas où la PCR a été réalisée au moyen de dCTP radioactif, celui-ci est incorporé lors de la formation des brins d'ADN. Les bandes d'amplification sont alors repérables par mesure de la radioactivité par le système **Instant Imager**. Cet appareil permet de mesurer la radioactivité contenue dans le gel. Pour cela, l'appareil détermine en chaque point la radioactivité émise et la représente par un point noir sur l'écran de l'ordinateur qui lui est relié. Le temps d'exposition nécessaire pour visualiser les bandes dépend de la radioactivité incorporée. Les cpm de chaque bande peuvent être calculés à partir du programme informatique, en créant des zones de calculs.

Les gels sont emballés dans du film plastique Saran et directement placé dans l'appareil de lecture.

2.4 *Amplification d'ADN par PCR*

2.4.1 **Description générale**

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une méthode de synthèse d'ADN in vitro à partir d'une matrice d'ADN. Le fragment amplifié sera celui compris entre les deux séquences " primer " ou amorces. Ces oligonucléotides synthétiques sont choisis en fonction de séquences connues pour amplifier le fragment voulu. Ces deux amorces pourront s'hybrider chacune, par complémentarité, à un des deux brins de l'ADN cible. Ces amorces sont nécessaires à la DNA polymérase pour initier la synthèse.

Pour obtenir un grand nombre de copies du fragment voulu, la réaction s'effectue en une série de cycles successifs comportant différentes étapes :

- La première étape est une étape de dénaturation à 94°C de l'ADN double brin pour permettre la fixation des amorces par la suite.
- La seconde étape est celle d'hybridation des primers. Le tube de réaction est refroidi pour atteindre une température spécifique aux amorces utilisées pour l'amplification. La température idéale correspond à la température de moins 5 degrés ; cette température fusion trouvée dans une abaque est calculée en fonction du nombre de Guanine et de Cytosine présentes dans la séquence des amorces. Elle est d'une part suffisamment basse pour permettre l'hybridation des amorces et d'autre part assez élevée pour empêcher les hybridations non spécifiques.
- L'étape suivante est l'étape d'élongation à 72°C, la température optimale pour que l'enzyme *Taq DNA polymerase* effectue la polymérisation de l'ADN. L'enzyme utilisée doit être thermo-résistante pour ne pas être inactivée à 94°C. Cette polymérase a été purifiée à partir d'une bactérie thermophile (*Thermus aquaticus*) trouvée dans les sources d'eau chaude.

En effectuant plusieurs cycles, on peut obtenir un nombre important de copies du fragment puisqu'à chaque cycle, les fragments nouvellement synthétisés servent de matrice pour la synthèse suivante. Le nombre de cycles effectués est variable, en général de 25 à 40.

2.4.2 PCR compétitive

2.4.2.1 Introduction

Lors de la PCR, la quantité de produit augmente de manière exponentielle, doublant à chaque cycle. Ceci est illustré par l'équation suivante : $N=N_0 \times 2^n$ dans laquelle N représente le nombre de molécules amplifiées, N_0 représente le nombre de molécules initiales et n correspond au nombre de cycles. Cependant, dans la pratique, seule une fraction des molécules-substrats sont amplifiées. En d'autres termes l'efficacité d'amplification n'est pas de 100%. L'équation ci-dessus est donc corrigée de la manière suivante: $N=N_0(1+E)^n$ dans laquelle E représente l'efficacité d'amplification variant de 0 à 1. Les principaux facteurs qui

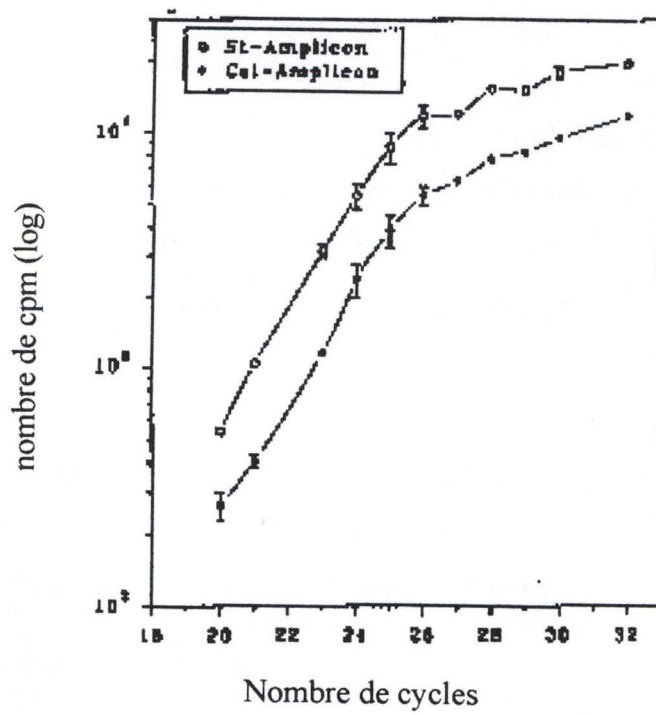


Fig.2.1. Parallélisme d'amplification du compétiteur et de l'ADNc (d'après Bouaboula *et al.*, 1992)

influencent cette efficacité sont la longueur et le pourcentage en GC de la séquence à amplifier, la séquence des amorces utilisées et la présence d'impuretés dans l'échantillon.

En effet, d'une séquence à l'autre, le pourcentage en G/C varie, induisant des structures secondaires qui peuvent influencer l'hybridation des amorces ainsi que la température d'hybridation. En ce qui concerne les impuretés, elles peuvent dégrader ou inhiber la polymérase, ou encore entrer en compétition avec le substrat pour la fixation des amorces.

Enfin, on peut également observer une petite différence d'efficacité entre deux tubes ayant subi le même nombre de cycles et provenant d'un même mélange de réaction initial

2.4.2.2 *Principe de la PCR compétitive*

La PCR compétitive permet de déduire, au départ d'une quantité connue de compétiteur amplifié de concert avec l'ADN cible, la quantité initiale de celui-ci dans l'échantillon. Cette technique nécessite de s'assurer que pour chaque paire de substrat (compétiteur / ADN cible), l'amplification des deux types de molécules reste parallèle au cours des cycles, ou du moins dans la partie exponentielle de la PCR qui précède la phase de saturation dite "plateau" (Figure 2.1).

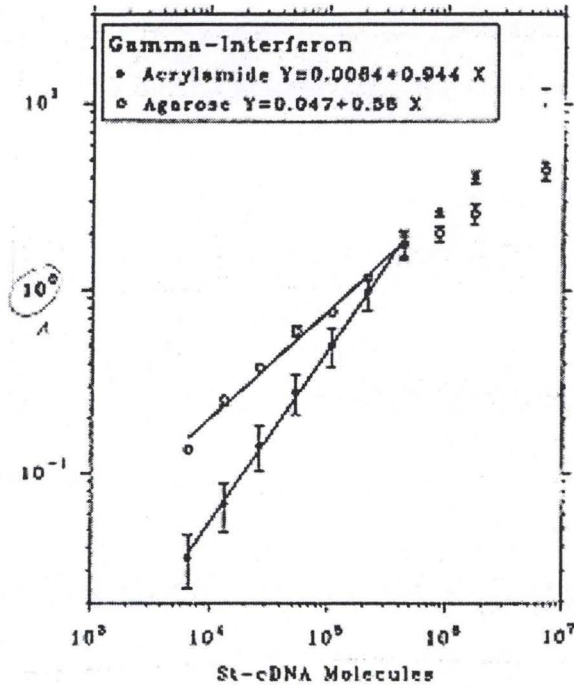
Si cette condition est respectée, et qu'une quantité donnée d'ADN cible est mélangée à des quantités variables connues d'ADN compétiteur, alors, à la fin de la réaction PCR le rapport entre la quantité de produits d'amplification du compétiteur et celle des produits de la cible permettra d'inférer le nombre de molécules initiales de la cible présente dans l'échantillon (Figure 2.2).

2.4.2.3 *Nature du compétiteur*

La présence du compétiteur dans l'amplification PCR est un moyen de contrôler les variations d'efficacité lors des différentes PCR.

La particularité du compétiteur est d'entrer en compétition avec la séquence cible pour l'amplification. En effet la séquence du standard est choisie pour être amplifiée par *les*

amplicon compétiteur/amplicon d'ADN cible (log)



Nombre de molécules du compétiteur (log)

Fig.2.2. Etude du rapport des amplicons de l'ADN compétiteur et de l'ADNc pour différentes dilutions du compétiteur et une quantité fixe d'ADNc (d'après Bouaboula *et al.*, 1992)

mêmes amorces que celles utilisées pour la séquence cible, c'est-à-dire que ce standard doit posséder aux extrémités 3' et 5' les séquences complémentaires aux amorces choisies pour amplifier une séquence cible donnée. Afin de distinguer le compétiteur de la séquence cible, ils auront des tailles différentes.

2.4.3 Tampon de la Taq DNA polymérase.

Composition du tampon 10 × :- Tris-HCl 100 mM

- MgCl₂ 15 mM
- KCl 500 mM pH 8.3

2.4.4 La réaction PCR

La réaction s'effectue dans un eppendorf de 0,2 ml où les réactifs suivants sont mis en présence : (pour 20 µl de réaction) : - 2 µl de tampon 10 ×

- 0,5 µl de dNTP 10 mM chacun
 - 0,25 µl de Taq DNA polymérase (Boehringer)
 - 1 µl d'amorce 3' (contenant 12,5 nmole/µl)
 - 1 µl d'amorce 5' (contenant 12,5 nmole/µl)
 - 1 µCi de dCTP radioactif (³²P)
 - x ng de plasmide ou x ng d'ADNc
- amener à 20 µl avec de l'eau RQ

Les séquences des oligonucléotides pour la PCR de la HA synthase sont

SYN 5' SD 5'-ATA-TGG-AAC-GGG-CTT-GTC-AG-3'

SYN 3' SD 5'-AGA-CTT-GTG-CCA-GCG-GTT-TG-3'

Les séquences des oligonucléotides pour la PCR de la Hyaluronidase, Hyal 2 sont

HYAL 5' SD 5'-ATC-ATC-ACA-CTG-GCC-CTA-GT-3'

HYAL 3' SD 5'-CTG-CTT-CAC-TAT-TCG-GTC-TG-3'

Les conditions de PCR pour les deux couples d'amorces sont les suivantes :

94	94	55	72	72	4°C
4'	<u>1'30''</u>	<u>1'30''</u>	<u>1'30''</u>	7'	over

35 cycles

Tableau 3.1. Osmolalités urinaires des différents rats (en mOsm).

<i>Rats hydratés</i>		<i>Rats déshydratés</i>	
Rat #	Osmolalité	Rat #	Osmolalité
H1	310	D1	5256
H2	254	D2	3576
H3	353	D3	4438
H4	300	D4	3946
H5	259	D5	5350
H6	359	D6	4820
Moyenne	306	Moyenne	4564
ESM	18	ESM	290
		Test t.	4×10^{-8}

3 Résultats

3.1 *L'ADNc de rein de rats hydratés et déshydratés*

3.1.1 Préparation des rats

Dans le cadre de ce travail, six rats ont été hydratés, et six autres déshydratés selon les protocoles décrits dans le Matériel & Méthodes. L'osmolalité des urines des différents rats a été mesurée au cours des dernières 12 heures de cette préparation. Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.1..

On constate que les deux groupes de rats diffèrent clairement entre eux et qu'ils sont assez homogènes du point de vue de leur réponse diurétique, qui correspond aux apports hydriques imposés. Nous avons donc atteint le but recherché, qui était d'obtenir deux groupes de rats distincts du point de vue de leur état de concentration urinaire.

3.1.2 Extraction de l'ARN des tissus

A la fin des 72 heures de conditionnement des rats, les reins ont été prélevés et nous avons disséqué au sein de chaque rein trois zones : la médullaire interne plus la papille, la médullaire externe et le cortex. Pour chaque rat, les deux médullaires internes (+ papille) ont été rassemblées ; il en est de même pour les deux autres parties. Le poids approximatif des différentes zones est de 15 mg pour la médullaire interne plus la papille, de 10 mg pour la médullaire externe et de 70 mg pour le cortex. Sur base de ces poids, la technique du Minikit (Qiagen) a été utilisée pour l'extraction de l'ARN des médullaires internes et externes, et celle du Midikit (Qiagen) pour les cortex. Pour chacune des extractions, l'étape d'éluion sur colonne a été répétée une seconde fois, pour s'assurer d'une bonne extraction de l'ARN.

La densité optique (D.O.) des ARN a été mesurée au spectrophotomètre à 260 nm et la concentration en ARN a été calculée à partir de ces D.O.. Les résultats sont présentés dans le

Tableau 3.2. Quantification des ARN extraits des différentes zones du rein (en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

		<i>Rats hydratés</i>			<i>Rats déshydratés</i>			
		Médullaire interne	Médullaire externe	Cortex	Médullaire interne	Médullaire externe	Cortex	
Elution 1	H1	0.070	0.128	0.052	D1	0.046	0.120	0.034
	H2	0.056	0.040	0.032	D2	0.068	0.028	0.030
	H3	0.194	0.266	0.932	D3	0.408	0.070	0.652
	H4	0.384	0.052	0.374	D4	0.770	0.356	0.428
	H5	0.120	0.320	1.76	D5	0.529	0.122	0.788
	H6	0.122	0.240	0.534	D6	0.324	0.068	0.991
Elution 2	H1	0.126	0.120	0.032	D1	0.104	0.164	0.026
	H2	0.086	0.130	0.008	D2	0.178	0.098	0.042
	H3	0.124	0.042	0.608	D3	0.170	0.038	0.226
	H4	0.140	0.096	0.234	D4	0.204	0.150	0.226
	H5	0.006	0.077	1.117	D5	0.272	0.037	0.496
	H6	0.025	0.129	0.992	D6	0.034	0.028	0.940

Tableau 3.3. Moyennes (\pm ESM) des rapports de D.O. 260/280 pour les ARN extraits des différentes zones du rein.

		<i>Rats hydratés</i>		<i>Rats déshydratés</i>	
		Moyenne	ESM	Moyenne	ESM
Médullaire interne		1.449	0.016	1.465	0.026
Médullaire externe		1.434	0.018	1.450	0.017
Cortex		1.725	0.067	1.685	0.048

Tableau 3.4. Quantités totales moyennes (\pm ESM) d'ARN extraites de chaque zone du rein (en μg).

	<i>Rats hydratés</i>	<i>Rats déshydratés</i>
Médullaire interne	7.27 \pm 1.90	15.54 \pm 3.97
Médullaire externe	8.11 \pm 1.27	6.40 \pm 1.94
Cortex	166.90 \pm 66.69	121.97 \pm 44.30

Tableau 3.5 Concentration et quantité totale d'ARN des cellules

	<i>Concentration ARN $\mu\text{g}/\mu\text{l}$</i>	<i>des Quantité d'ARN</i>	<i>totale Rapport des D.O. à 260 et 280 nm</i>
Cellules tubulaires	3.220	34.4 μg	1.82
Cell. interstitielles 1	0.214	9.34 μg	1.60
Cell. interstitielles 2	0.140	7.65 μg	1.63

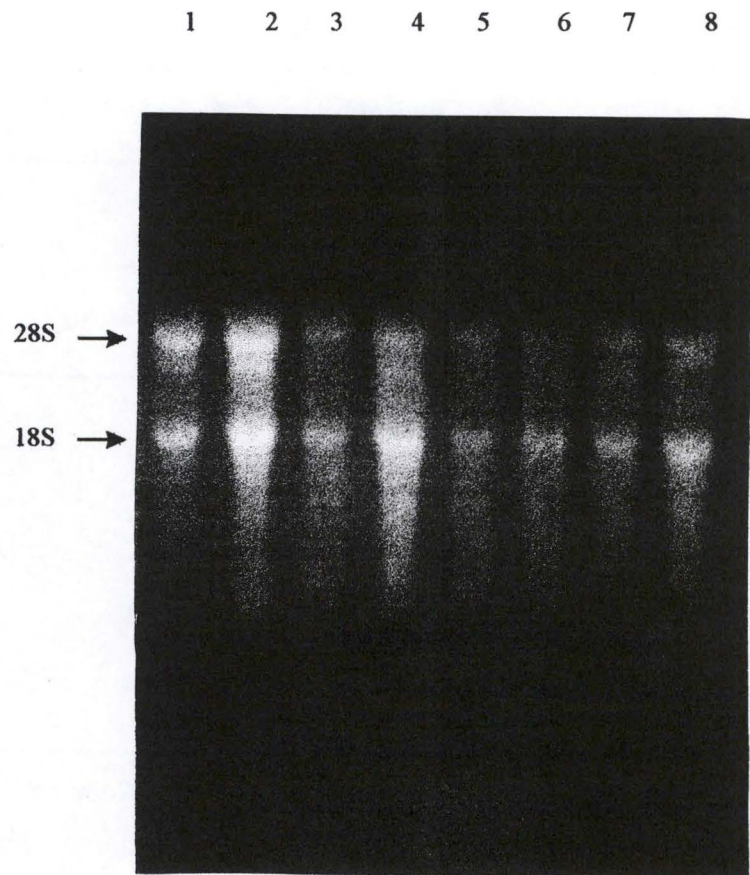


Fig.3.1. Représentation de la migration en gel d'agarose de l'ARN de cortex de rats hydratés: (piste 1 à 4) et déshydratés (pistes 5 à 8) . La position des ARN ribosomiques 18S et 28S sont indiqués sur la figure.

Tableau 3.2.. Des quantités satisfaisantes d'ARN ont pu être obtenues de chaque fragment, à la première ou à la seconde élution. Lors de ces mesures, le rapport des D.O. 260 nm / 280 nm a également été contrôlé. Les moyennes de ces rapports ont été effectuées pour les différentes zones du rein et sont présentées dans le Tableau 3.3.. Pour les médullaires, le rapport moyen est proche de 1,5, ce qui est acceptable, les normes habituelles étant comprises entre 1,5 et 1,9 pour des échantillons mesurés dans l'eau non tamponnée. Pour le cortex, le rapport est d'environ 1,7. Il n'y a pas de différence significative entre les rapports 260/280 pour les rats hydratés et déshydratés.

La quantité totale moyenne d'ARN extraite de chaque zone a été calculée pour évaluer le rendement de la méthode. Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.4.. Nous avons obtenu des quantités moyennes d'ARN d'environ 10 µg pour les fragments de médullaire et de 150 µg pour les fragments de cortex, mais les variations d'un rat à l'autre sont très importantes. Ceci est vraisemblablement dû à l'étape d'homogénéisation des tissus.

Les ARN n'ont pas été systématiquement déposés sur gel d'agarose, pour estimer leur qualité, car la quantité totale était relativement faible. Nous avons cependant effectué quelques essais, dont un exemple pour le cortex est montré à la Figure 3.1.. Nous observons la présence de deux bandes bien nettes correspondant aux ARNr 28S et 18S. Il n'y a pas de signe majeur de dégradation. Notons aussi que la réaction de PCR pour le messager de la GAPDH nous a permis d'estimer que la qualité des ARN préparés était bonne.

3.1.3 Extraction de l'ARN de cellules rénales en culture

Des cellules interstitielles et tubulaires de la médullaire interne du rein de rat ont été mises en culture au laboratoire. Deux populations distinctes de cellules interstitielles sont récoltées grâce à un gradient de densité dans lequel ces cellules sédimentent à des niveaux différents. La couche supérieure est dénommée I1; l'inférieure, I2. Les ARN de toutes ces cellules ont été extraits au moyen du Minikit Qiagen et leurs concentrations calculées à partir des D.O. mesurées. La concentration de ces ARN, la quantité totale d'ARN ainsi que le rapport 260nm /280nm sont présentés dans le Tableau 3.5..

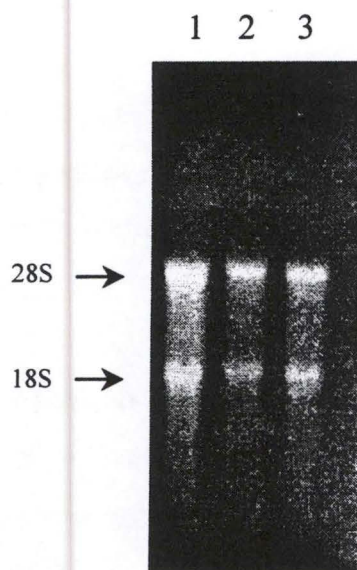


Fig.3.2. Représentation de la migration en gel d'agarose de l'ARN de cellules.

Piste 1: ARN de cellules tubulaires

Piste 2: ARN de cellules interstitielles I1

Piste 3: ARN de cellules interstitielles I2

La position des ARN ribosomiques 18S et 28S sont indiqués sur la figure.

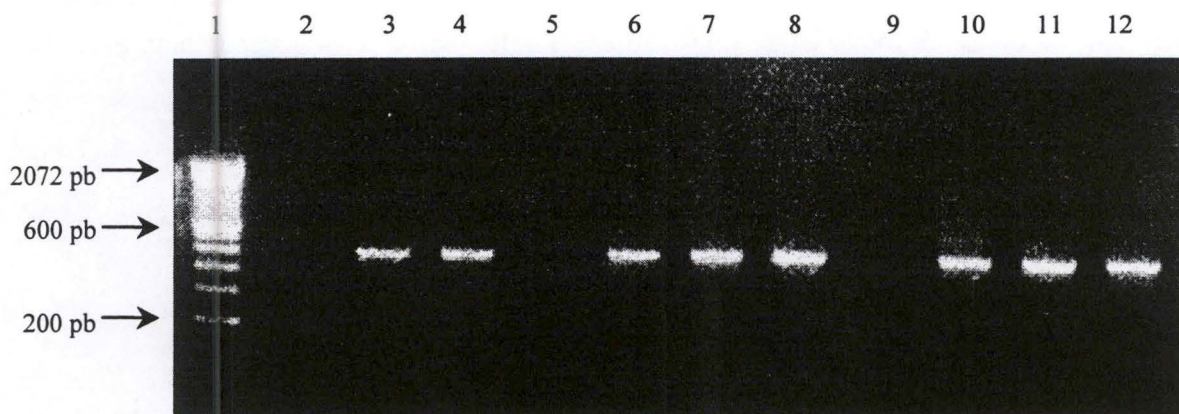


Fig 3.3. Représentation de la migration en gel d'agarose des amplifications PCR GAPDH contrôle de l'étape de transcription reverse. Aucun produit d'amplification n'est observé dans les pistes 2, 5 et 9 ce qui témoigne du fait que l'ADNc n'a pas été

Piste 1: standard de poids moléculaire 100pb (BRL)

Les ARN de ces cellules ont été déposés sur gel d'agarose en vue de déterminer leur qualité, qui est satisfaisante (Figure 3.2.).

3.1.4 Synthèse des ADNc

Pour chacun des ARN extraits, de l'ADNc a été synthétisé. Nous avons choisi pour cette synthèse la fraction élue dont la concentration en ARN est la plus importante. Deux cents nanogrammes d'ARN sont utilisés à chaque fois. Avant d'entamer les étapes plus lourdes de la PCR compétitive, nous avons vérifié la quantité et la qualité d'ADNc obtenu pour chaque échantillon. Pour cela, on y a détecté le messager de la GAPDH, une protéine ubiquiste qui est souvent utilisée pour contrôler l'extraction d'ARN rénal de rat (Nicoletti and Sassy-Prigent, 1996). La β -actine serait un autre choix valable (Chen *et al.*, 1993). Le messager de la GAPDH est amplifié par une PCR de 35 cycles au moyen des amorces spécifiques GAPDH 5'SD et GAPDH 3'SD dont les séquences sont données dans le MATERIEL & METHODES. Le produit obtenu est déposé sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium, ce qui permet de le visualiser. La présence d'une bande de forte intensité de 490 pb témoigne du bon état de l'ARN total extrait, du bon déroulement de l'étape de transcription réverse et de celui de la PCR GAPDH (Figure 3.3.).

3.2 Mise au point des PCR compétitives

La PCR compétitive a été choisie dans le but de quantifier l'expression des gènes de l'hyaluronidase et de l'hyaluronan-synthase. Le gène de la GAPDH sert ici de contrôle supplémentaire en ce sens que l'amplification du couple compétiteur/ADN cible de la GAPDH ne devrait pas varier en fonction des différentes conditions physiologiques.

3.2.1 Construction des compétiteurs

Nous avons voulu quantifier par la technique de PCR compétitive les ADNc de l'hyaluronan-synthase, de l'hyaluronidase et de la GAPDH. Cette méthode demande la création d'un standard interne qui puisse entrer en compétition avec la séquence-cible et qui

en soit différent, par exemple en taille, en vue de pouvoir séparer sur gel les deux produits d'amplification. Dans notre cas, une séquence d'une centaine de paires de bases a été insérée dans le segment d'ADN qui sera amplifié. Par conséquent, les séquences complémentaires aux amorces restent présentes et l'amplicon du compétiteur est de taille supérieure à l'amplicon du segment d'ADN dont on veut quantifier l'expression.

3.2.1.1 Le "compétiteur Hyal"

3.2.1.1.1 L'ADNc de Hyal2 de rein de rat

Le laboratoire dispose d'un clone entièrement séquencé d'ADNc d'une forme rénale d'hyaluronidase du rat appelée Hyal2. Ce clone correspond à un insert de 1,9 Kb cloné en *EcoRI* dans le plasmide pBluescript SK. Cet insert contient une phase ouverte de lecture de 1422 pb, encodant une protéine de 473 acides aminés. Ce clone est appelé **pSK- Hyal**.

3.2.1.1.2 Les constructions pSD-Hyal et pHyal-st.

a) Le pSD-Hyal

La construction du "compétiteur Hyal" consiste à insérer le site multiple de clonage du pSK, dans un site de restriction unique de l'ADNc d'Hyal2. Comme le plasmide pSK-Hyal ne possède pas de site de restriction unique, une étape de sous-clonage est nécessaire.

Le plasmide pSK-Hyal est restreint en *KpnI-EcoRI* pour obtenir un fragment de 646 pb de l'ADNc de Hyal2. Ce fragment contient le site *HincII*, unique dans l'ADNc de Hyal 2. Cet insert est purifié et introduit par ligation dans le plasmide pBluescript SK, également restreint en *KpnI-EcoRI*, qui a ainsi perdu un fragment contenant le site *HincII*. Le mélange de ligation est utilisé pour transformer la souche DH11S d'*E. coli*. Quelques colonies de transformants sont inoculées dans 5 ml de milieu de culture (LB+Ampicilline) et des minipréparations d'ADN sont réalisées sur ces minicultures pour récupérer le plasmide. Les différentes préparations d'ADN sont restreintes en *EcoRI* et *KpnI* en vue de différencier les matrices refermées sur elles-mêmes et les plasmides contenant l'insert. En effet, la double restriction *KpnI - EcoRI* doit, dans ce dernier cas, sortir un insert de 646 pb. Le plasmide

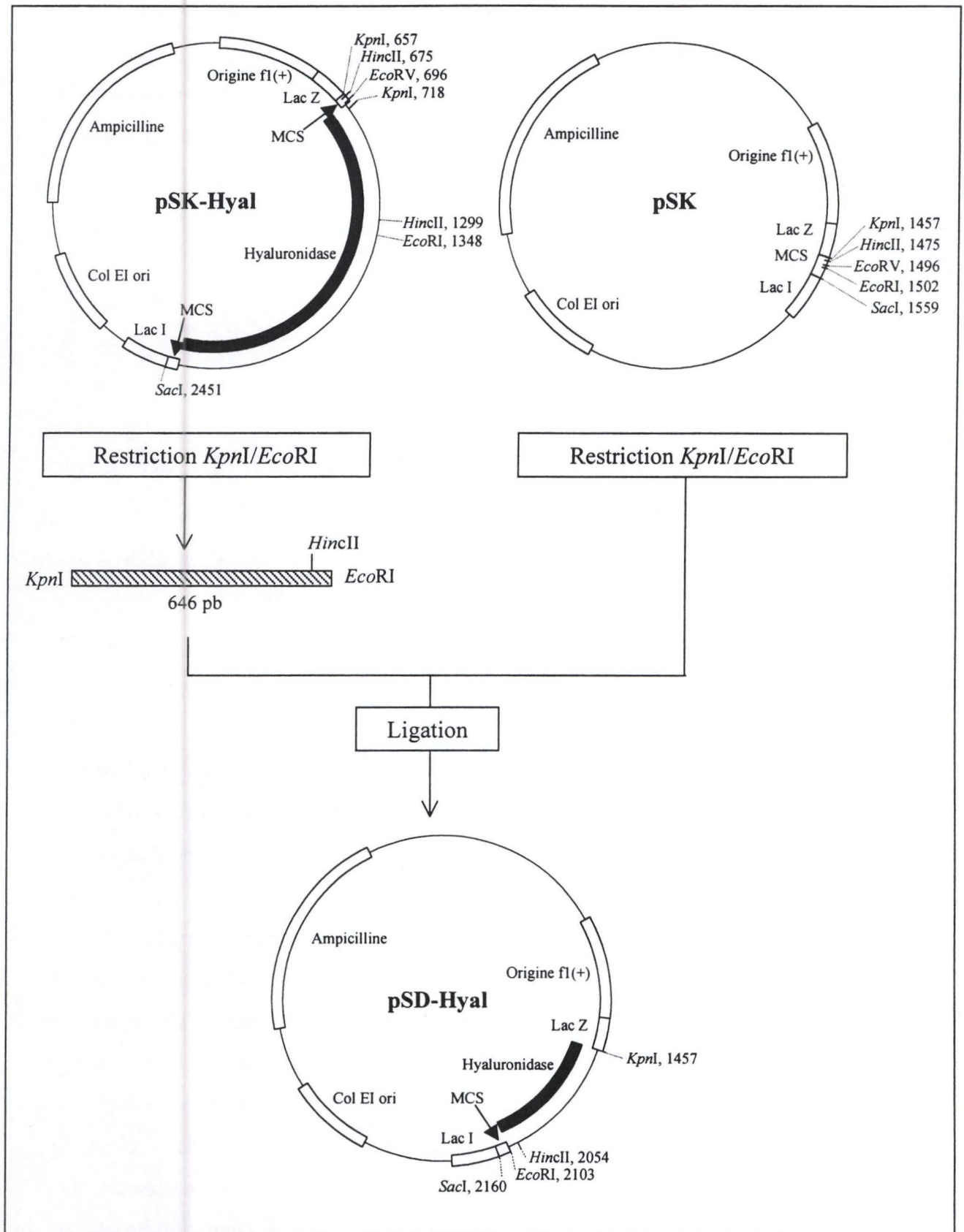


Fig. 3.4. Stratégie de construction du pSD-Hyal.

recombinant d'intérêt a été préparé par une midi-préparation d'ADN. Ce nouveau plasmide est appelé **pSD-Hyal**. Ce sous-clonage est schématisé à la Figure.3.4..

b) pHyal-st

L'étape suivante est l'insertion d'un fragment d'une centaine de paires de bases dans un site situé entre les séquences des deux amorces de PCR. Ainsi, la taille du fragment amplifié à partir du plasmide compétiteur sera plus grande que celui amplifié à partir du pSD-Hyal. Dans ce but, le plasmide pSK est restreint en *KpnI* – *SacI* de manière à sortir le site multiple de clonage du plasmide pSK. Cet insert est purifié sur gel d'agarose et mis à bout franc par la Klenow, puis il est récupéré pour permettre une ligation dans le pSD-Hyal restreint à bouts francs par *HincII* et déphosphorylé.

La souche DH11S d'*E. coli* est transformé par le mélange de ligation et les bactéries étalées sur milieu LB contenant de l'ampicilline. Des cultures de 5 ml sont lancées à partir des transformants et l'ADN plasmidique des transformants est obtenu par minipréparation. Les minipréparations sont soumises à une restriction diagnostique *HincII* et *KpnI*. Des fragments de 3038 et 675 pb sont attendus. Une midi-préparation d'ADN plasmidique est alors réalisée au départ d'un clone présentant ces fragments afin d'obtenir suffisamment de matériel pour les étapes suivantes. La Figure 3.6. présente les résultats de la double restriction effectuée sur cette midi-préparation. Le nouveau plasmide obtenu est nommé **pHyal-st**. Ce sous-clonage est schématisé à la Figure.3.5..

3.2.1.2 Le "compétiteur Synthase"

3.2.1.2.1 Un plasmide contenant un fragment PCR d'une synthase rénale de rat

Le laboratoire ne dispose pas encore d'un clone complet d'ADNc de l'hyaluronan-synthase rénale du rat. Le matériel disponible est un produit de PCR de 300 pb obtenu à partir d'ADNc de rein de rat au moyen d'oligonucléotides dégénérés. Après séquençage, il s'avère que ce produit de PCR est homologue à la séquence de l'hyaluronan-synthase 3 (has3) de souris. Ce produit a été inséré en *EcoRV* dans le plasmide pSK. Le plasmide obtenu, **pSK-syn**, va servir de départ à la construction du "compétiteur synthase".

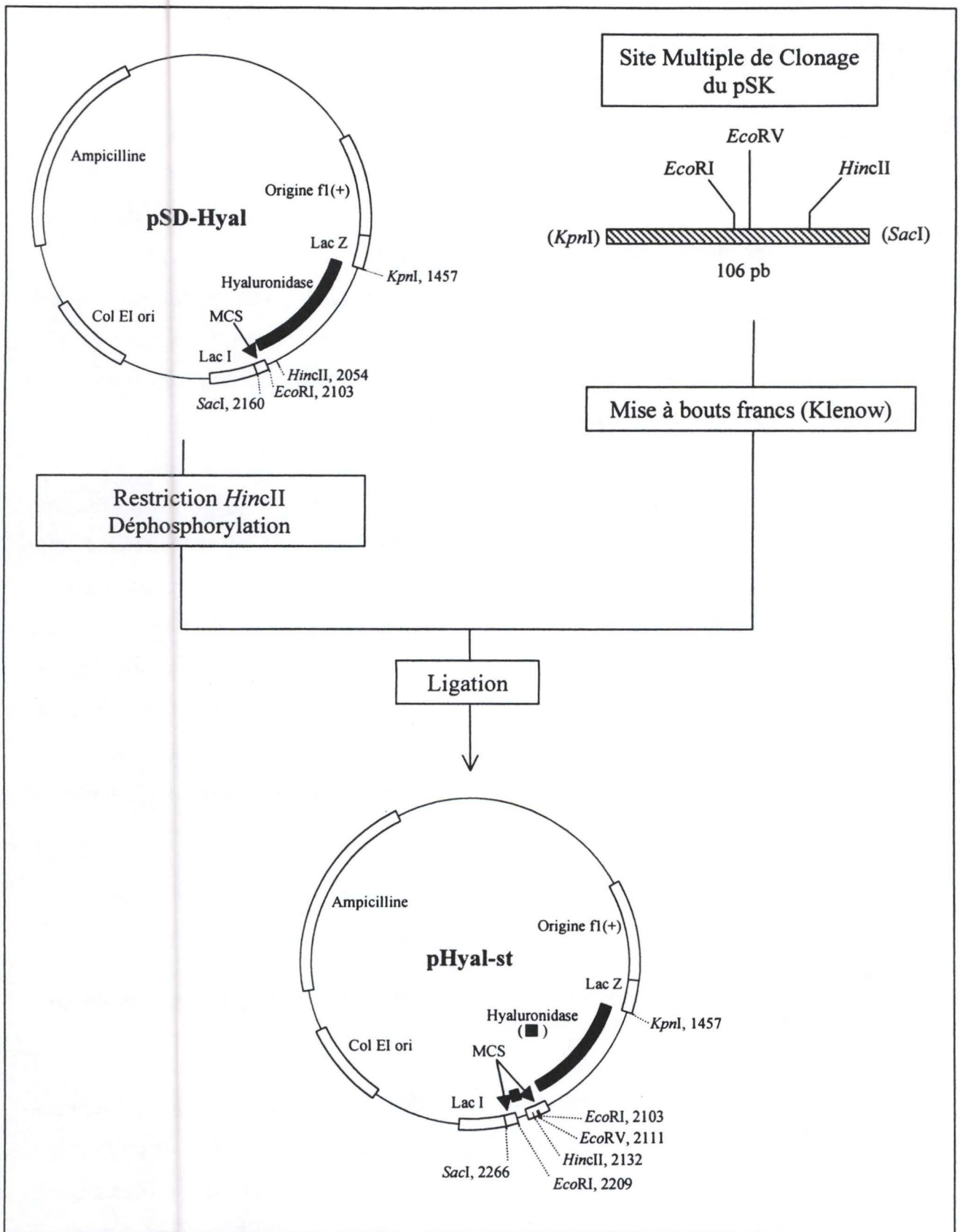


Fig. 3.5. Stratégie de construction du « compétiteur hyaluronidase ».

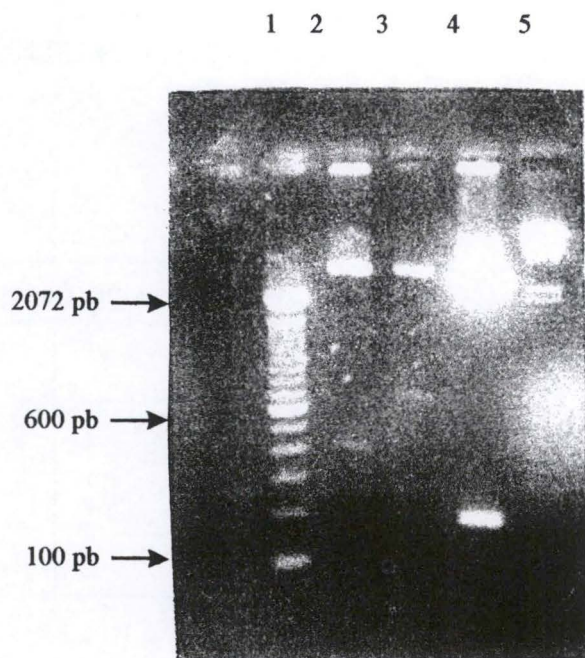


Fig.3.6. Représentation de la photo de la migration en gel d'agarose 1% d'ADN plasmidique

Piste 1: Marqueur de poids moléculaire 100 pb.

Piste 2: Restriction *EcoRI* du pGAPDH-st (l'insert de 400 pb est peu visible)

Piste 3: Restriction *KpnI-HincII* du pHyal-st (l'insert de 600 pb est peu visible)

Piste 4: Restriction *EcoRI* du pSyn-st

Piste 5: Marqueur de poids moléculaire λ restreint par *HindIII*

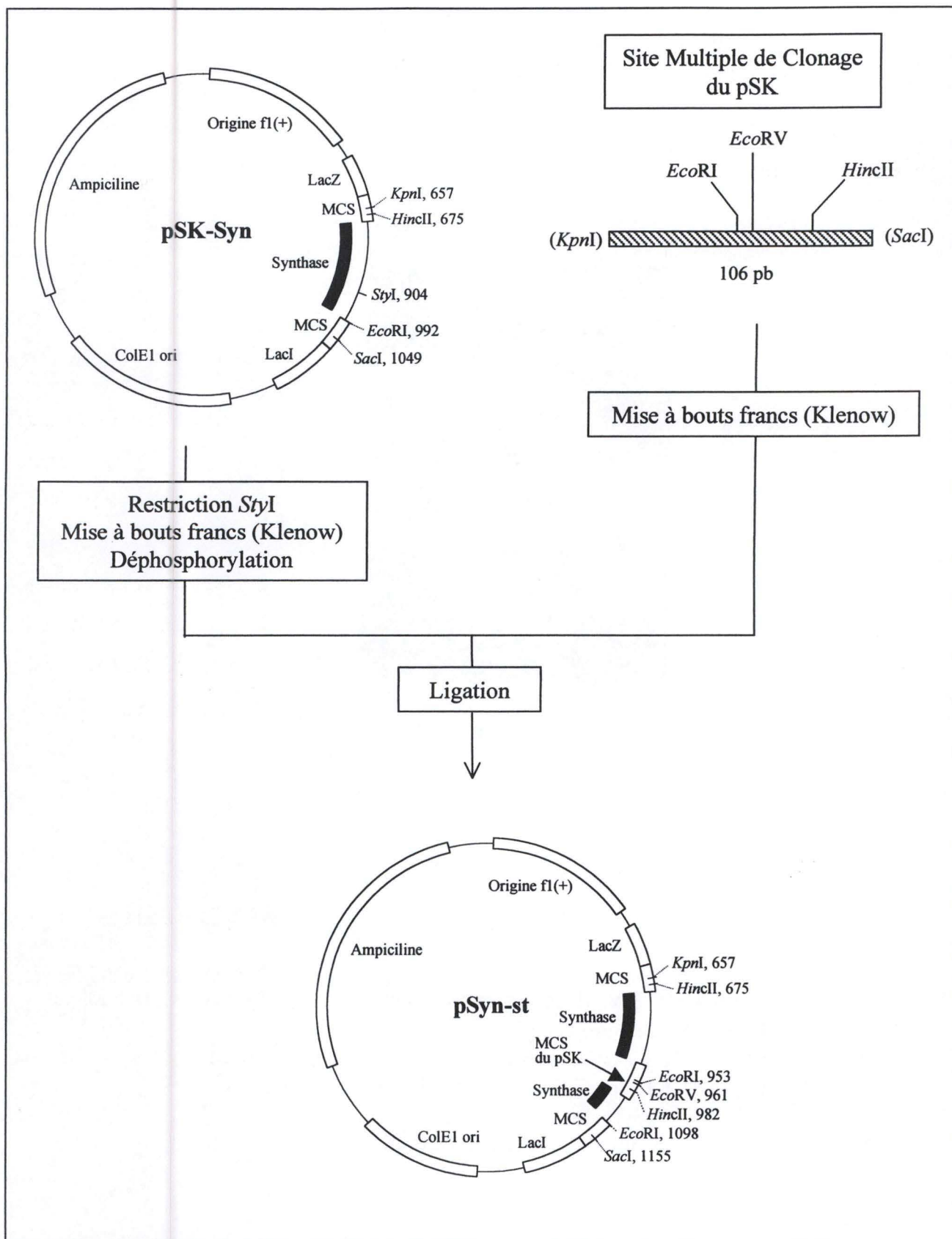


Fig. 3.7. Stratégie de construction du « compétiteur Synthase ».

3.2.1.2.2 La construction pSyn-st

Ce plasmide pSK-Syn est restreint par l'enzyme *StyI*, coupant en un site unique dans l'ADNc de la synthase. Le plasmide ainsi ouvert est mis à bouts francs par la Klenow, puis déphosphorylé. D'autre part, l'insert correspondant au site multiple de clonage isolé du plasmide pSK par une double restriction *KpnI* – *SacI* est purifié sur gel et mis à bouts francs par la Klenow.

Le pSK-Syn linéarisé est ligué avec l'insert purifié. Après un nuit à 14°C, le mélange de ligation est transformé par électroporation dans la souche DH11S d'*E. coli* et étalée sur milieu LB+Ampicilline. Des mini-préparations d'ADN plasmidique de transformants sont soumises à une restriction diagnostique par *EcoRI*. En effet le site *EcoRI* est présent d'une part dans la matrice, au niveau du site multiple de clonage d'origine de celle-ci, et d'autre part dans l'insert. La taille des fragments attendus est de 145 pb et 3212 pb. Une midi-préparation est lancée au départ d'un clone présentant le profil de restriction attendu. La Figure 3.6. présente les résultats de cette restriction *EcoRI* effectuée sur la midipréparation. Ce plasmide recombinant est nommé **pSyn-st**. Ce sous-clonage est schématisé à la Figure 3.7..

3.2.1.3 Le "compétiteur GAPDH"

3.2.1.3.1 Un plasmide contenant un fragment PCR de la GAPDH de rat

Le matériel disponible est un produit de PCR de 490 pb obtenu à partir d'ADNc de rein de rat au moyen d'oligonucléotides spécifiques de la GAPDH de rat. Ce fragment a été inséré en *EcoRV* dans le plasmide pSK. Le plasmide obtenu, **pSK-GAPDH**, va servir de départ à la construction du "compétiteur GAPDH".

3.2.1.3.2 La construction pGAPDH-st

Cette construction a été réalisée en suivant les même étapes que lors de la construction du compétiteur synthase. Le plasmide **pSK-GAPDH** est restreint en un site unique *StyI* et les extrémités sont mises à bouts francs puis déphosphorylées. L'insert

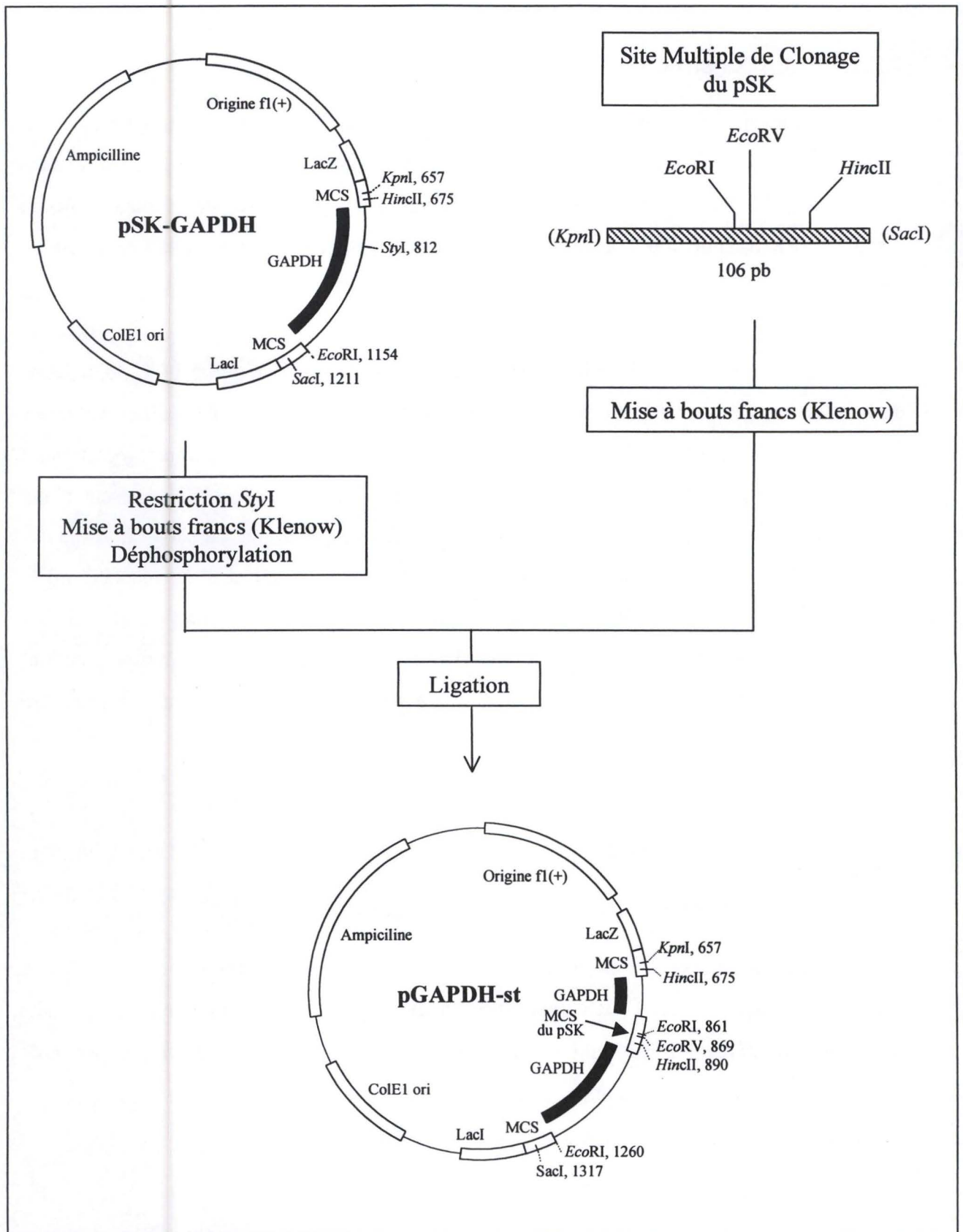


Fig. 3.8. Stratégie de construction du « compétiteur GAPDH ».

correspondant au site multiple de clonage du plasmide pSK est mis à bouts francs par la Klenow.

La ligation de pSK-GAPDH linéarisé avec l'insert purifié est effectuée pendant une nuit à 14°C et le mélange de ligation est transformé dans *E. coli* par électroporation. L'ADN plasmidique des transformants est extrait par minipréparation et une restriction en *EcoRI* est réalisée. Les tailles attendues des fragments sont de 399 pb et de 3058 pb. En effet, dans le cas où le site multiple de clonage du pSK est bien présent, *EcoRI* coupera une fois dans cet insert et une fois dans le gène de la GAPDH. Le clone présentant le fragment de 399 pb après restriction est utilisé pour lancer une midi-préparation. Le résultat de la restriction *EcoRI* effectuée sur cette midi-préparation est présenté à la Figure 3.6.. Ce nouveau plasmide est appelé **pGAPDH-st**. Ce sous-clonage est schématisé à la Figure 3.8..

3.2.2 Réaction de PCR compétitive

Les séquences des oligonucléotides utilisés sont données dans le MATERIEL & METHODES.

3.2.2.1 Mise au point des conditions

Les compétiteurs ayant été construits, ceux-ci et les ADN-cibles correspondants peuvent être soumis à une réaction PCR, dans le but de réaliser la PCR compétitive. Mais pour cela, différentes étapes de mises au point sont nécessaires. Il faut d'abord choisir la méthode de détection. Notre choix s'est porté sur l'incorporation de dCTP radioactifs dans les amplicons, ce qui permet une quantification directe des produits obtenus au moyen d'un appareil compteur de radioactivité. Les autres techniques de quantification des produits PCR, par exemple l'intensité d'une coloration au bromure d'éthidium ou avec d'autres dérivés fluorescents sont soit plus complexes, soit nécessitent des équipements non disponibles.

Le gel d'acrylamide a été préféré au gel d'agarose en raison d'un moindre bruit de fond lors des mesures de la radioactivité (Bouaboula *et al.*, 1992).

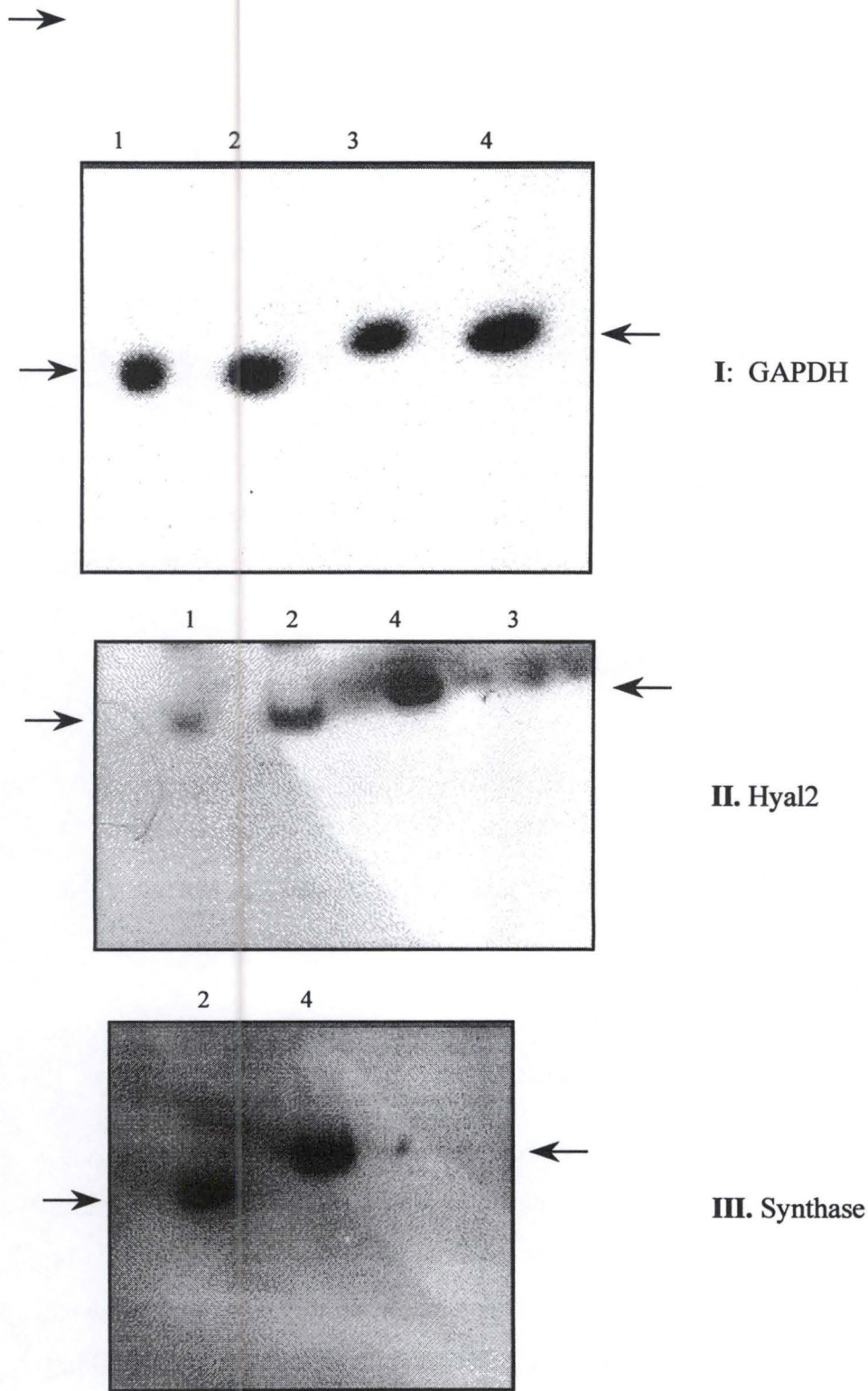


Fig. 3.9. Autoradiogrammes des migrations en gel de polyacrylamide 5% des amplicons d'ADN cible et d'ADN compétiteur au départ de 10 et 100 ng de plasmide contenant respectivement la séquence cible (pistes 1: 10 ng et 2: 100ng) et la séquence du compétiteur (piste 3: 10 ng et 4: 100 ng) respectivement de la GAPDH (I), de Hyal2 (II) et de la synthase (III). Les flèches indiquent la position des bandes d'amplification.

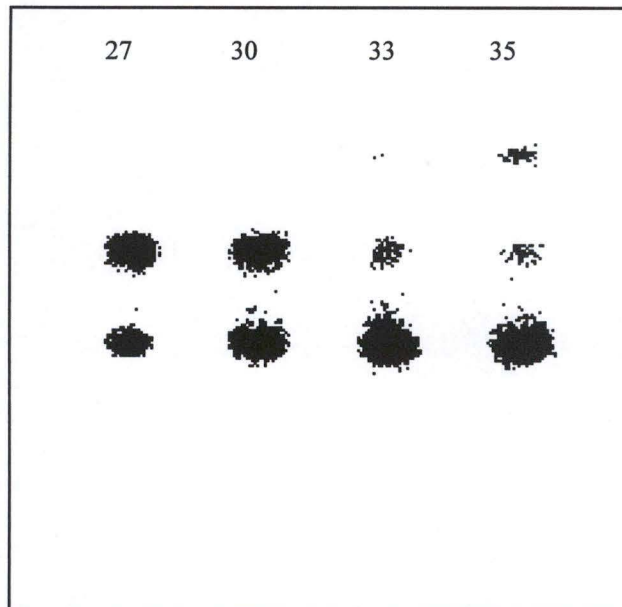
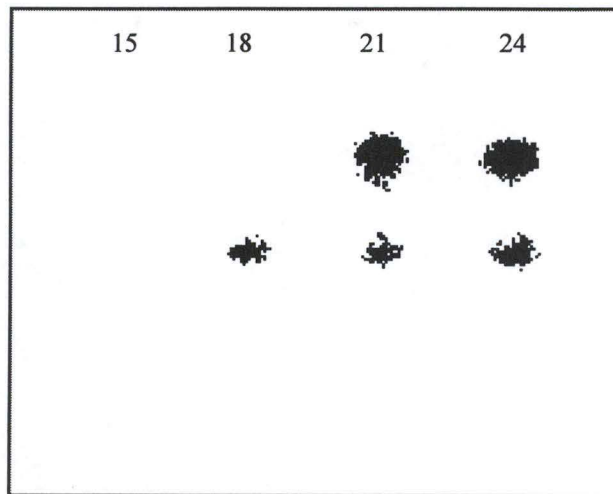


Fig.3.10. Représentation de la migration en gel d'acrylamide 5% des produits de l'amplification PCR en parallèle de l'ADN cible et de l'ADN compétiteur de la GAPDH au départ des plasmides pSK-GAPDH et pGAPDH-st retirés à différents nombres de cycles. Ceux-ci sont indiqués en haut des pistes.

Différentes concentrations de gel d'acrylamide non dénaturant ont été testées. Les conditions optimales de séparation des amplicons, qui diffèrent de 100 pb, ont été obtenues avec un gel 5 % non dénaturant. Un gel encore moins concentré donnerait sans doute une séparation supérieure, mais le gel devient alors extrêmement difficile à manipuler. Notre choix a donc été le gel de 5 %.

Finalement, différentes concentrations des plasmides compétiteurs et des plasmides ayant servi à la construction de ces compétiteurs ont été soumises à la réaction PCR, puis les produits PCR ont été déposés sur gel. Pour chacun des plasmides, c'est la concentration de 100 pg / μ l qui se révèle la plus adéquate (Figure 3.9.).

3.2.2.2 *Test de parallélisme*

Pour s'assurer que l'amplification de l'ADN cible (plasmidique ou ADNc) et de son compétiteur garde la même efficacité tout au long des cycles de la PCR, un mélange contenant tous les réactifs pour la PCR et des dCTP radioactifs est préparé et aliquoté par 20 μ l. Ces différents tubes sont placés dans la machine PCR; aux cycles 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33 et 35, un tube PCR est enlevé et placé dans la glace.

Les produits PCR prélevés aux cycles successifs sont séparés sur gel d'acrylamide et l'intensité de chacune des bandes est mesurée grâce à l'Instant Imager. Les résultats d'expériences "représentatives" pour chacune des constructions sont montrés dans la Figure 3.10.. Ces résultats ne montrent pas le parallélisme d'amplification attendu. Les expériences ont été répétées à de nombreuses reprises, en changeant tous les réactifs de la PCR, mais sans aucune amélioration notable. Les différents problèmes rencontrés sont :

- Lors des cycles successifs, certaines bandes apparaissent et disparaissent.
- Lors des cycles proches de 35, il est courant d'observer une nouvelle bande de forte intensité et de taille inférieure aux autres bandes, alors que les bandes précédentes disparaissent progressivement. Cette nouvelle bande pourrait correspondre à une des deux bandes attendues ou à ces deux bandes confondues.
- Un autre problème est qu'aucune régularité dans les PCR n'était observée. L'inconstance des résultats nous a mené à soupçonner un dysfonctionnement de la machine PCR. Un

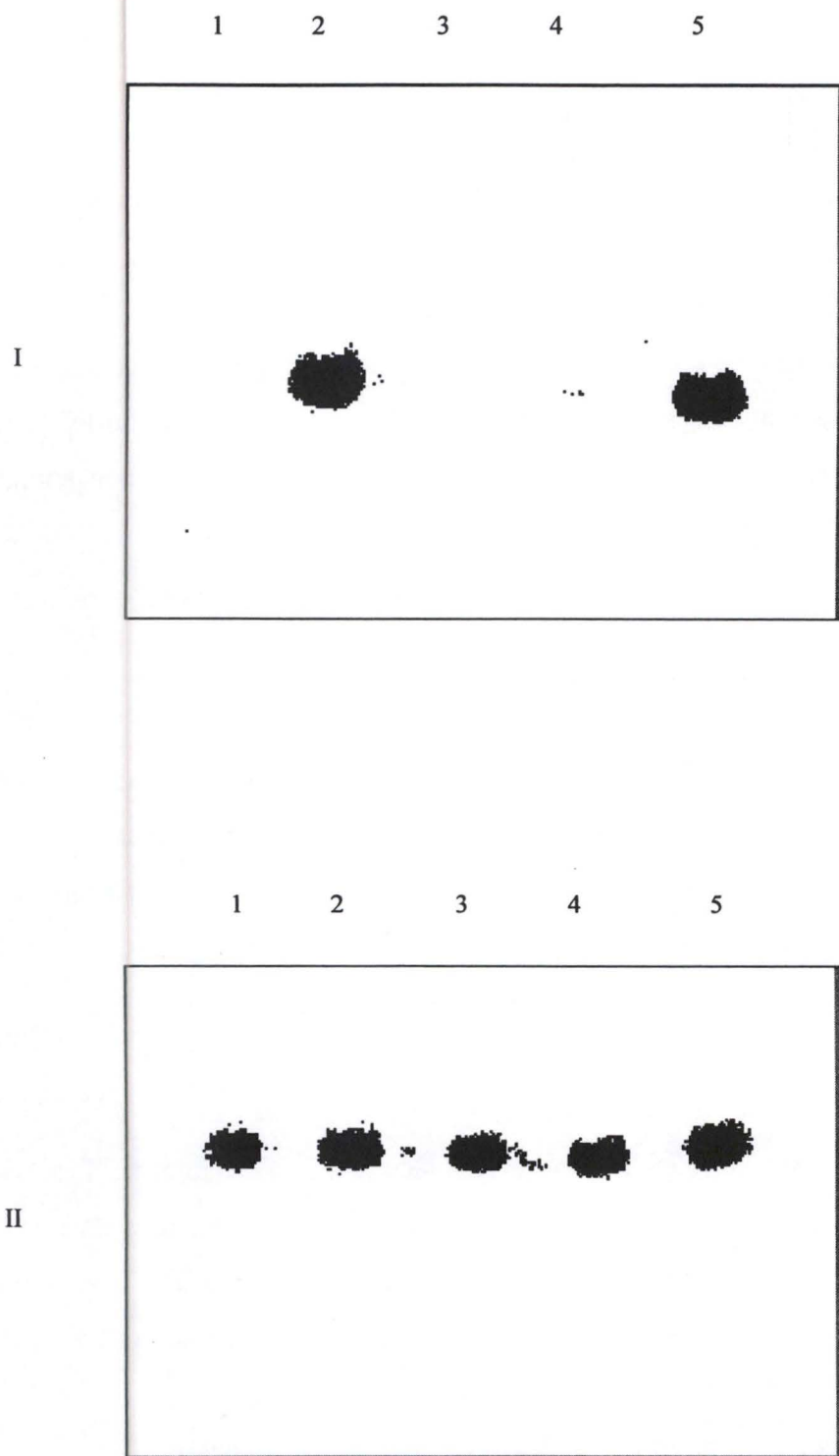


Fig.3.11. Image des migrations en gels d'acrylamide 5% des produits d'amplification de 5 PCR GAPDH réalisées sur la machine du laboratoire (I, pistes 1 à 5) et sur une machine MRJ (II, piste 1 à 5).

mélange de 200 μ l contenant le plasmide pSK-GAPDH et les oligonucléotides d'amplification de la GAPDH a donc été préparé puis aliquoté en 10 tubes de 20 μ l. Cinq tubes ont été placés dans la machine du laboratoire et les cinq autres dans une autre machine PCR (MRJ Research). La comparaison des résultats a confirmé les problèmes de variation d'amplification dus à la machine PCR du laboratoire (Figure 3.11.).

Les problèmes de la PCR compétitive n'ayant pas pu être résolus dans les limites de temps imposées pour le mémoire, une autre orientation a été suivie dans les dernières semaines afin d'obtenir une réponse, même partielle, à la question de savoir si l'expression de l'hyaluronidase rénale était modifiée par les conditions d'hydratation des rats. Pour cela, une analyse semi-quantitative de l'expression de Hyal2, de l'hyaluronan-synthase et de la GAPDH a été effectuée.

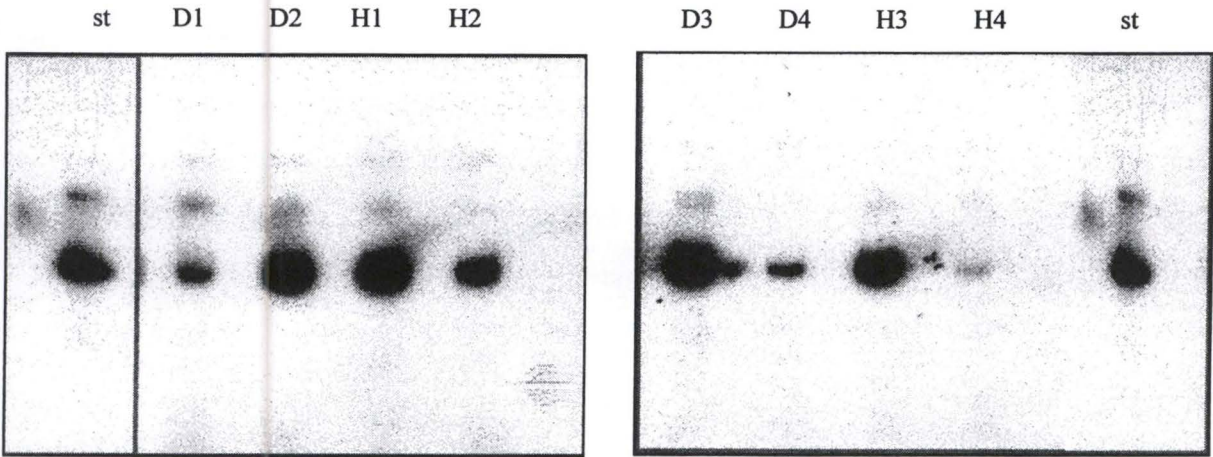
3.3 La PCR semi-quantitative

3.3.1 Introduction

Cette démarche consiste à amplifier séparément par PCR, les séquences codantes de ces trois protéines présentes dans les différents ADNc préparés. Nous n'avons pas changé les conditions de détection des produits PCR ; dès lors, la PCR se déroule en présence de dCTP radioactifs et le produit PCR est déposé sur gel d'acrylamide. L'intensité de l'amplicon, dans chaque cas, est mesurée grâce à l'Instant Imager.

Pour un même ADNc, on dispose donc de trois amplifications : la synthase, l'hyaluronidase et la GAPDH. Cette GAPDH sert de contrôle interne à la transcription reverse. En effet, ce gène codant pour une protéine de structure, son expression doit rester constante dans les différentes conditions. Une différence d'intensité du spot GAPDH est donc dû à une différence au niveau de la quantité d'ADNc synthétisée. Par conséquent, l'intensité des spots synthase et hyaluronidase sera également variable en fonction de l'efficacité de la transcription reverse. C'est pourquoi, les mesures pour la synthase et l'hyaluronidase seront, dans chaque cas, rapportées à la mesure faite pour la GAPDH sur cet ADNc.

Hyal2



GAPDH

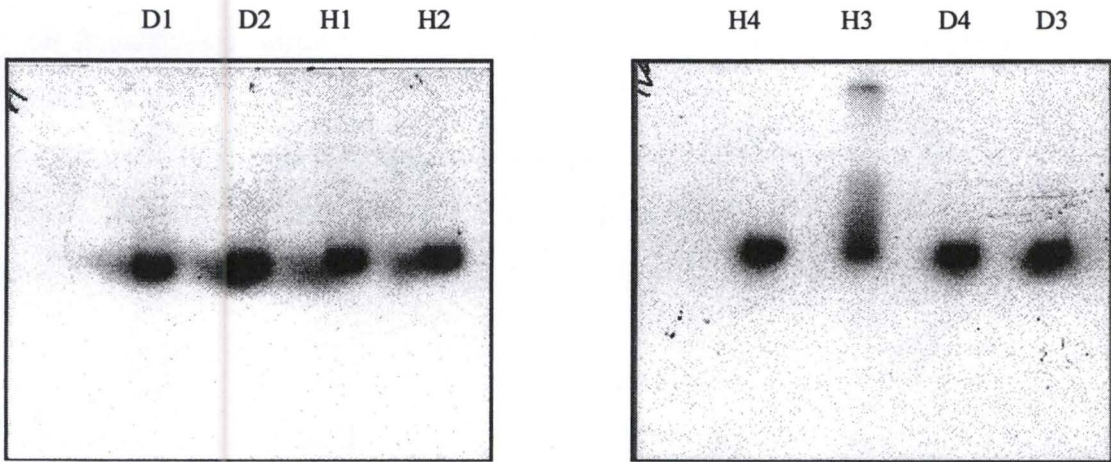


Fig. 3.12. Autoradiogrammes des migrations en gels d'acrylamide 5% des produits PCR Hyal2 et GAPDH obtenus à partir de l'ADNc de médullaire interne de rats déshydratés (D1 à D4) et hydratés (H1 à H4). La piste «st» correspond à l'amplification de Hyal2 à partir le plasmide pSD-Hyal

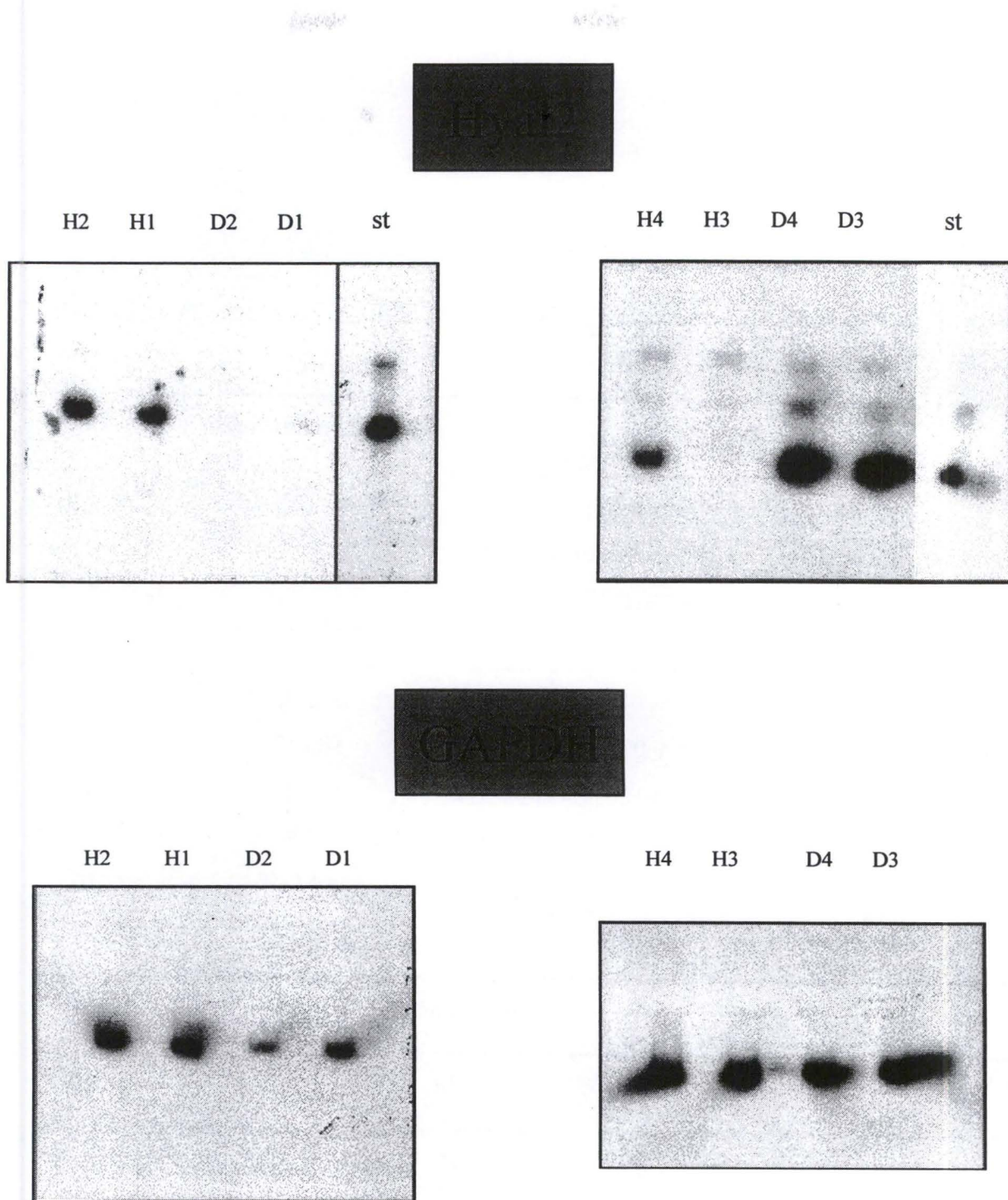


Fig. 3.13. Autoradiogrammes des migration en gel d'acrylamide 5% des produits PCR Hyal2 et GAPDH obtenus à partir de l'ADNc de médullaire externe de rats déshydratés (D1 à D4) et hydratés (H1 à H4). La piste «st» correspond à l'amplification de Hyal2 à partir du plasmide pSD-Hyal.

Tableau 3.6. Quantification des produits PCR pour l'hyaluronidase dans la médullaire interne

	<i>Rats hydratés</i>		<i>Rats déshydratés</i>		
	Intensité de la GAPDH (cpm/mm ²)	Rapport de l'hyaluronidase à la GAPDH		Intensité de la GAPDH (cpm/mm ²)	Rapport de l'hyaluronidase à la GAPDH
H1	132.79	0.141	D1	113.08	0.030
H2	89.95	0.078	D2	103.67	0.147
H3	62.69	0.186	D3	112.30	0.153
H4	100.96	0.013	D4	103.80	0.024
H5	104.28	0.020	D5	19.06	0.016
H6	134.84	0.086	D6	142.37	0.020
Moyenne	104.25	0.087	Moyenne	99.05	0.065
S.E.M	12.19	0.030	S.E.M	18.70	0.030
P=			0.575		

Tableau 3.7. Quantification des produits PCR pour l'hyaluronidase dans la médullaire externe.

<i>Rats hydratés</i>			<i>Rats déshydratés</i>		
	Intensité de la GAPDH	Rapport de l'hyaluronidase à la GAPDH		Intensité de la GAPDH	Rapport de l'hyaluronidase à la GAPDH
H1	124.71	0.027	D1	75.40	0.09
H2	127.18	0.035	D2	32.60	0.013
H3	98.35	0.015	D3	119.60	0.145
H4	113.62	0.036	D4	105.16	0.190
H5	79.85	0.138	D5	85.82	0.061
H6	122.41	0.009	D6	41.63	0.041
Moyenne	111.02	0.043	Moyenne	76.70	0.077
S.E.M	8.31	0.021	S.E.M	15.42	0.033
P=	0.379				

3.3.2 La médullaire interne

Les ADNc de la médullaire interne des différents rats hydratés et déshydratés ont été soumis aux trois PCR citées ci-dessus. Les produits PCR ont été déposés sur gel d'acrylamide. Des autoradiographies ont été réalisées à partir de ces gels. Différents temps d'exposition ont été nécessaires : un temps court (10 min) pour révéler le compétiteur et un temps long (30 min) pour révéler les bandes d'intérêt (Figure 3.12.).

L'intensité de la GAPDH et les rapports des mesures effectuées pour l'hyaluronidase par rapport aux mesures de la GAPDH sont rapportés dans le Tableau 3.6.

Les résultats ne montrent aucune différence significative pour l'expression du gène de l'hyaluronidase entre les deux populations de rats. En effet, si les moyennes sont légèrement différentes, les écarts à la moyenne sont dans les deux cas très élevés. Le test de Student confirme l'absence de signification statistique.

Les résultats pour l'hyaluronan synthase n'ont pas pu être mesurés en raison de l'absence de la bande de taille attendue parmi différentes bandes amplifiées.

3.3.3 La médullaire externe

La démarche précédente a été répétée pour l'ADNc de la médullaire externe. Les résultats de la migration des produits PCR sur gel d'acrylamide sont présentés à la Figure 3.13..

Le Tableau 3.7. présente l'intensité de la GAPDH et le rapport de l'intensité de l'amplicon Hyal à la GAPDH.

Au niveau de la médullaire externe, les résultats ne montrent pas non plus d'induction de l'expression du gène lors des différentes conditions physiologiques testées. Dans ce cas également les moyennes diffèrent mais les écarts à la moyenne sont également élevés.

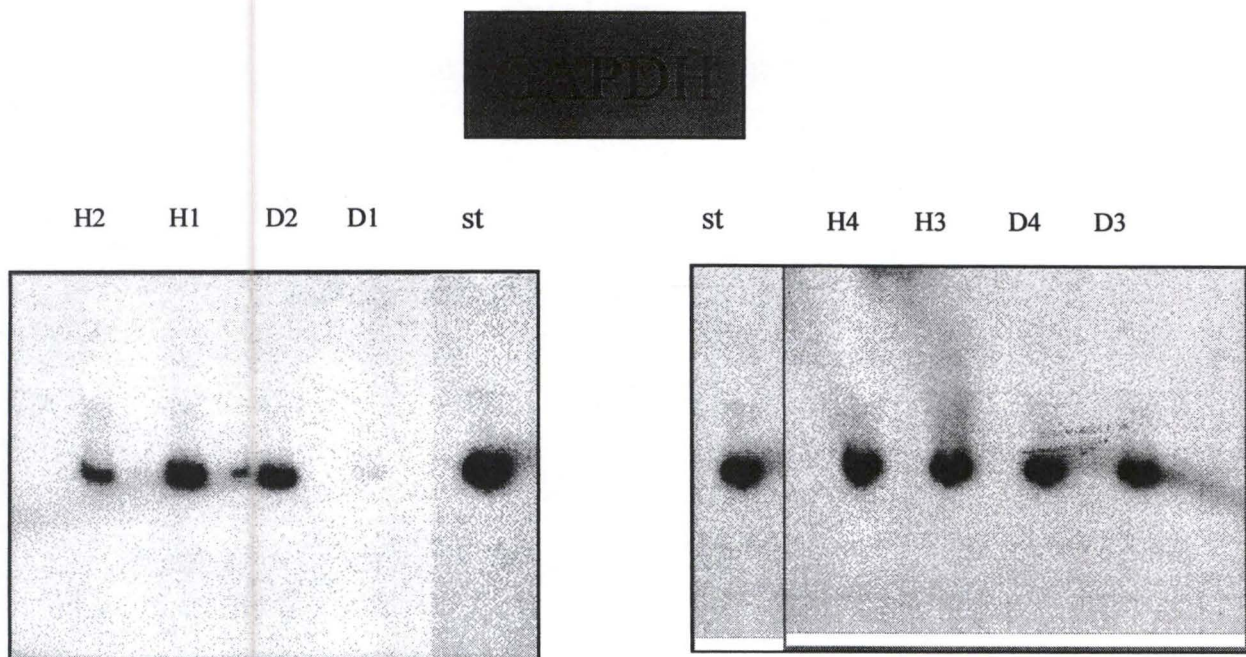
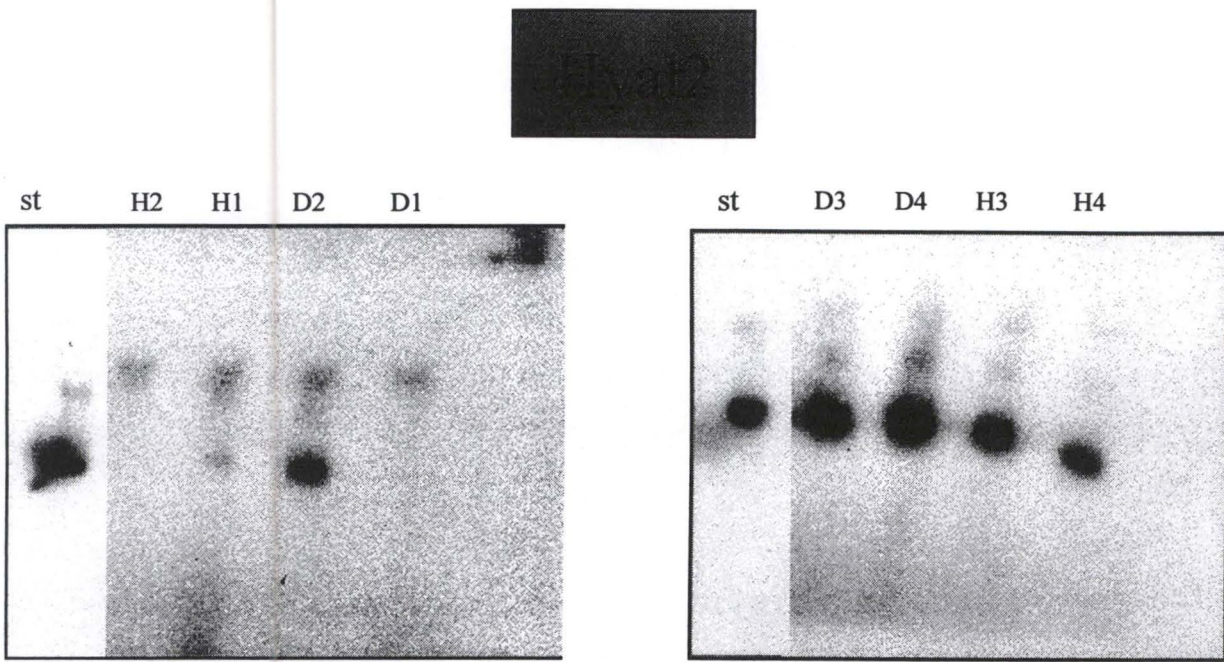


Fig. 3.14. Autoradiogrammes des migrations en gels d'acrylamide 5% des produits PCR Hyal2 et GAPDH obtenus à partir de l'ADNc de cortex de rats déshydratés (D1 à D4) et hydratés (H1 à H4). Les pistes «st» correspondent respectivement à l'amplification de Hyal2 à partir du plasmide pSD-Hyal et à l'amplification de la GAPDH à partir du plasmide pSK-GAPDH.

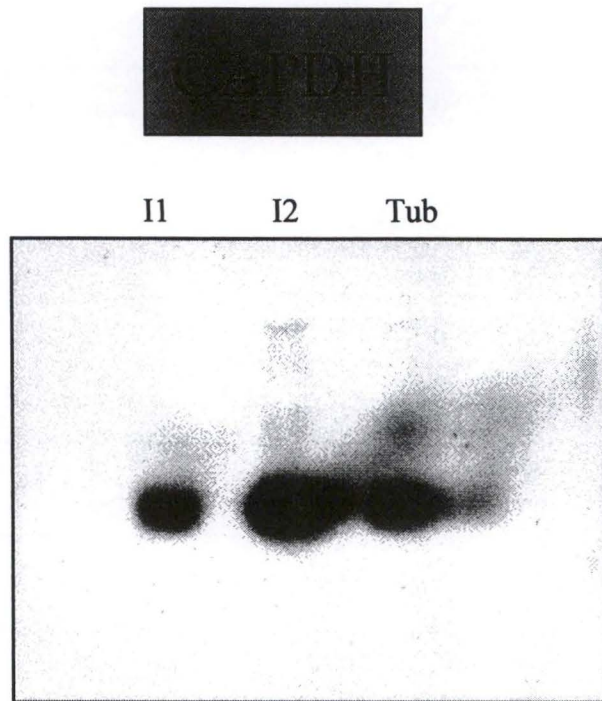
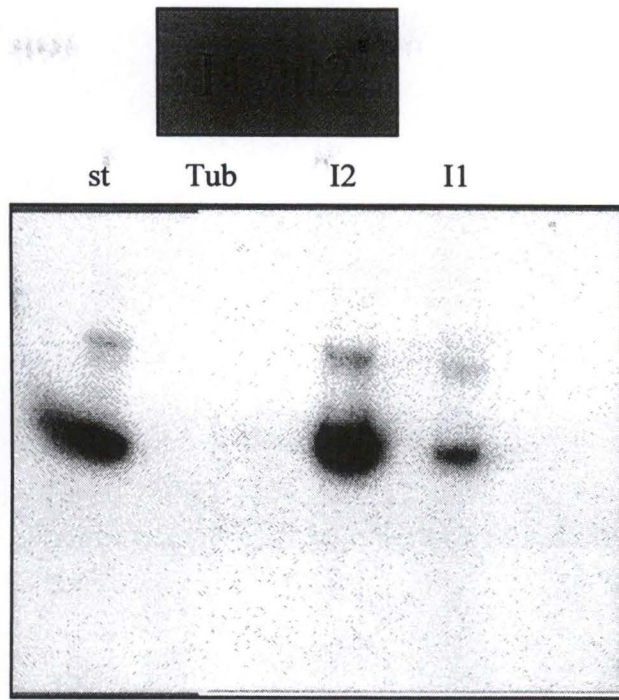


Fig. 3.15. Autoradiogrammes des migrations en gel d'acrylamide 5% des produits PCR Hyal2 et GAPDH obtenus à partir de l'ADNc de cellules intersticielles I1 et I2 ainsi que de cellules tubulaires. La piste «st» correspond à l'amplification de Hyal2 à partir du plasmide pSD-Hyal

Tableau 3.8. Quantification des produits PCR pour l'hyaluronidase dans le cortex

	<i>Rats hydratés</i>		<i>Rats déshydratés</i>		
	Intensité de la GAPDH	Rapport de l'hyaluronidase à la GAPDH		Intensité de la GAPDH	Rapport de l'hyaluronidase à la GAPDH
H1	74.03	0.017	D1	2.16	0.222
H2	32.63	0.018	D2	96.87	0.045
H3	128.99	0.064	D3	102.40	0.132
H4	85.95	0.059	D4	107.17	0.139
H5	57.44	0.024	D5	32.55	0.011
H6	(a)	(a)	D6	(a)	(a)
Moyenne	75.81	0.036	Moyenne	68.23	0.110
S.E.M	17.92	0.012	S.E.M	23.90	0.042
P=			0.095		

(a) les données pour ces rats sont non mesurables car aucun signal n'est perçu pour la GAPDH.

Tableau 3.9. Quantification des produits PCR pour l'hyaluronidase pour les cellules interstitielles et tubulaires

	<i>Intensité de la GAPDH</i> (cpm/mm ²)	<i>Rapport de</i> <i>l'hyaluronidase à la</i> <i>GAPDH</i>
Cellules tubulaires	51.48	0.056
Cellules interstitielles 1	72.35	0.277
Cellules interstitielles 2	177.14	0.553

Les résultats pour l'hyaluronan-synthase ne sont pas disponibles pour les mêmes raisons que dans le cas de la médullaire interne.

3.3.4 Le cortex

L'ADNc de cette région est également soumis aux trois PCR semi-quantitatives. La Figure 3.14. présente les résultats sur gel d'acrylamide et le Tableau 3.8., le rapport des intensités de l'hyaluronidase et de la GAPDH.

Dans le cortex, les moyennes des rapports hyaluronidase/GAPDH sont visiblement différentes lorsqu'on compare les rats hydratés et déshydratés. Cependant, ici aussi, les variations sont grandes au sein de chaque groupe de rats, et le test de Student ne fait que s'approcher du seuil de signification statistique de 5%, sans l'atteindre. Nous ne pouvons donc pas aboutir à une conclusion ; des expériences supplémentaires seraient nécessaires.

3.3.5 Les cellules interstitielles et tubulaires

La même démarche a été suivie pour les cellules interstitielles I1 et I2 et les cellules tubulaires en culture primaire provenant de la médullaire interne de rats identiques. Les produits PCR pour Hyal2 et GAPDH ont été déposés sur gel d'acrylamide et l'intensité des bandes a été mesurée . La Figure 3.15. présente les résultats obtenus pour l'hyaluronidase et la GAPDH pour les différentes cellules. Les rapports des intensités des amplicons sont présentés dans le Tableau 3.9..

Ces résultats témoignent de la présence en grande quantité du messager de l'hyaluronidase dans les cellules interstitielles de la médullaire interne, surtout dans le type I2. Etant donné qu'il s'agit d'une expérience unique, il ne faut pas en tirer des conclusions hâtives, mais s'il se confirme, ce résultat pourrait révéler de nouvelles fonctions pour les cellules interstitielles. Notons qu'un signal est présent dans les cellules tubulaires également, mais qu'il est beaucoup plus faible.

4 Discussion et perspectives

Ce travail comporte plusieurs volets, certains fructueux, d'autres moins.

Le but du travail était de quantifier l'expression d'ARN messagers peu abondants dans de petits fragments de tissu rénal. Les enzymes qui nous intéressent, l'hyaluronidase et l'hyaluronan-synthase, sont en effet faiblement exprimées dans le rein entier, peut-être parce qu'elles sont restreintes à certains types cellulaires.

4.1 *Choix des techniques*

La première étape a donc été de choisir la technique de RT-PCR quantitative plutôt que le Northern blot ou même la technique de protection à la RNase, car la RT-PCR est la plus sensible. En effet, la méthode de RNase protection, par exemple, nécessite généralement de 5 à 10 μg d'ARN par dosage, or les rendements obtenus pour les extractions d'ARN totaux des médullaires interne et externe sont inférieurs à ce chiffre. La PCR compétitive, elle, ne nécessite que 200 ng d'ARN, voire moins si ses conditions sont affinées.

Pour être tout à fait quantitative, cette RT-PCR nécessite une méthode de compétition. On ajoute dans la réaction de PCR un plasmide compétiteur c'est-à-dire un plasmide porteur de la séquence étudiée qui a été mutée. Les mesures des produits de réaction peuvent être effectuées aussi bien pendant la phase exponentielle de la PCR que pendant la phase de plateau, pour autant que l'on ait prouvé que l'amplification du compétiteur et de l'ADN-cible s'effectuent de façon parallèle. La RT-PCR compétitive exige cependant de nombreuses étapes préalables afin de s'assurer qu'on en contrôle bien tous les paramètres. Des fragments d'ADNc de trois enzymes ont été ciblés, l'hyaluronidase, l'hyaluronan-synthase et la GAPDH.

Une fois le choix de la RT-PCR opéré, il fallait construire les compétiteurs. Cette partie du travail a abouti aux résultats espérés ; les restrictions diagnostiques ont montré à chaque fois les fragments de taille attendue. Par ailleurs, l'extraction d'ARN des différents morceaux de rein et la préparation d'ADN complémentaire au départ de celui-ci ont été satisfaisants.

4.2 Résultats concernant l'expression de la hyaluronan-synthase

Cependant, dès que l'on est passé à l'amplification des segments d'ADNc choisis, il a fallu constater que, si les produits PCR de taille attendue étaient bien obtenus pour l'hyaluronidase et la GAPDH, en revanche, pour l'hyaluronan-synthase, on ne parvenait pas à obtenir des produits corrects au départ de l'ADNc des fragments de rein. Des bandes de plus grandes et/ou plus petites apparaissaient de façon difficilement reproductible.

Les raisons de ce profil d'amplification inattendu pour la synthase n'ont pu être déterminées clairement. Tout d'abord, il faut rappeler que l'amplification du plasmide contenant les 300 pb de la synthase donnait de bons résultats ; les amorces choisies sont donc spécifiques pour cette séquence qui ressemble très fortement à la synthase de souris.

Ensuite, nous avons envisagé la possibilité que les amorces choisies amplifiaient, dans le tissu rénal, un fragment des autres ARN messagers d'hyaluronan-synthases, provenant du gène HAS1 ou HAS2. Cependant, les séquences de ces différentes synthases sont très proches l'une de l'autre et le produit PCR ne pourrait donc pas être de taille supérieure.

On pourrait également penser que la préparation d'ADNc de rein de rat est contaminée par de l'ADN génomique, et ce malgré l'étape protectrice à la Dnase qui a été appliquée dans tous les cas. Cette hypothèse est réfutée par les résultats de tests PCR effectués sur des échantillons d'ARN qui ont été choisis après avoir constaté que leur donnait un aspect très " sale " sur le gel. Ces tests n'ont pas montré d'apparition systématique d'une

bande de taille plus élevée. L'hypothèse d'une contamination des échantillons d'ARN par de l'ADN génomique ne nous semble pas pouvoir être retenue.

On peut envisager aussi le fait qu'en raison de la petite taille de son amplicon (300 pb ; c'est le plus petit des fragments amplifiés dans le présent travail), le fragment "synthase" ne serait pas amplifié de façon suffisamment fiable. Ceci semble peu probable, car on dispose d'observations antérieures montrant qu'une RT-PCR compétitive peut être parfaitement réussie avec des fragments de 290 et 370 pb (Bouaboula *et al.*, 1992). Certains auteurs ont néanmoins rapporté le fait qu'en dessous de 1 kb, le parallélisme d'amplification entre un ADN-cible et son compétiteur pourrait ne pas être respecté à tous les cycles de la PCR, mais cela ne concerne pas spécifiquement le problème observé ici.

De toute façon, lorsque l'ADNc de l'hyaluronan-synthase rénale (ou des isoformes de synthase exprimées dans le rein) sera cloné, une amplification sur un fragment (éventuellement plus long) d'ADNc sera plus fiable. De plus, lorsque les gènes de l'hyaluronidase et de la synthase seront connus, il sera intéressant de reconstruire les plasmides en choisissant des amorces PCR situées sur des zones à cheval sur un exon et un intron de manière à ne jamais amplifier d'ADN génomique.

D'ici là, il faudrait confirmer qu'il s'agit bien d'une séquence synthase fortement exprimée dans le rein. Nous pourrions aussi, tout en utilisant le fragment de 300 pb, tenter de changer certaines conditions de la PCR, notamment la température ou la concentration en Mg^{2+} . De nouvelles amorces pourraient également être testées.

4.3 Résultats des PCR semi-quantitatives

Les différentes étapes nécessaires à la mise au point de la PCR compétitive n'ayant pas pu être menées à bon terme, la technique de PCR compétitive a dû être abandonnée. Les nombreuses irrégularités au niveau des PCR dues aux problèmes techniques de la machine ont été un facteur non négligeable de perte de temps. De plus, il s'avère que la PCR compétitive est une technique très difficile à mettre au point.

Afin d'obtenir malgré tout des résultats interprétables en ce qui concerne la question initialement posée, à savoir si les quantités d'ARNm de l'hyaluronidase et de l'hyaluronan-synthase sont modifiées lors des variations d'apport hydrique, nous nous sommes tournés vers la PCR "semi-quantitative", en utilisant, comme "standard interne" à l'échantillon, l'amplification d'un ARNm normalement constant dans le rein, quelles que soient les circonstances physiologiques, à savoir l'ARNm de la GAPDH (Nicoletti et Sassy-Prigent, 1996). Effectivement, nous avons constaté que d'une manière générale, l'amplification de la bande GAPDH ne variait guère, même entre les deux groupes de rats (hydratés/déshydratés). Néanmoins, une étude de la courbe d'amplification de la GAPDH devrait être réalisée dans le but de s'assurer qu'après 30 cycles, l'amplification de la GAPDH n'est pas déjà au plateau, ce qui pourrait fausser les résultats.

Quels résultats interprétables avons-nous obtenu avec la PCR semi-quantitative ?

Tout d'abord, en ce qui concerne l'ARNm de l'hyaluronidase, aucune différence d'expression significative n'a été relevée entre l'état d'hydratation et l'état de déshydratation des rats. Rappelons toutefois que ce résultat n'exclut pas une variation discrète non décelée par cette méthode "semi-quantitative". De plus, avant de conclure que l'hydratation ne modifie pas l'expression de l'hyaluronidase, il faudrait s'assurer que, dans les conditions que nous avons utilisées, les ARNm de protéines connues pour être modulées par les variations d'apport hydrique étaient effectivement modifiés. Nous pensons pour cela avant tout à l'ARNm de l'aquaporine-2, le canal hydrique spécifique de la paroi apicale des tubules collecteurs, dont l'expression est induite par la déshydratation (Benoit *et al.*, 1996).

Les rats ont été volontairement hydratés ou déshydratés pendant une période relativement longue, de 72 heures. Cette période a été choisie dans le but d'obtenir des populations homogènes, ce qui fut effectivement le cas. L'absence de changement de l'expression du messager après 72 heures de variations hydriques n'exclut cependant pas que ces messagers soient modifiés plus tôt dans le courant de la déshydratation ou de l'hydratation forcées, par exemple après 12 ou 24 heures. Il n'est pas rare en effet d'observer un pic d'induction d'ARNm à ce moment après différentes manoeuvres physiologique ou physiopathologiques. Cette situation peut aboutir à la production de protéines dont la durée de vie pourrait être suffisamment longue pour se traduire par l'augmentation d'activité

hyaluronidasique à 72 heures, comme le laboratoire de Physiologie et Pharmacologie l'a mesuré précédemment (Flamion *et al.*, 1997). Les quantités d'ARNm seraient alors retombées à la normale à ce moment.

Une autre hypothèse est que l'hyaluronidase rénale, comme une série d'autres enzymes, peut-être activée sans changement de sa quantité d'ARNm. Enfin, on peut émettre l'hypothèse que l'activité hyaluronidasique détectée au laboratoire ait été due à une autre hyaluronidase que celle encodée par le gène Hyal2.

Pour démontrer que l'hyaluronidase est induite ou non au cours des variations d'apport hydrique, il faudrait compléter les expériences par des mesures de l'ARNm *in situ*.

4.4 Résultats des PCR sur les cellules rénales cultivées

La présence du messager de Hyal2 dans les cellules interstitielles médullaires internes en culture est très intéressante. Ces cellules pourraient participer au mécanisme de concentration des urines, en modifiant la composition de l'interstitium et/ou en servant de connexion entre les tubules et les vasa recta à cet endroit du rein. Si elles expriment effectivement l'hyaluronidase, elles pourraient donc dégrader un composant essentiel de la matrice extracellulaire de la médullaire interne. Si cette activité augmente lors de la déshydratation, comme le laissaient penser les résultats des mesures biochimiques effectuées précédemment par le laboratoire, la diminution de l'hyaluronan extracellulaire pourrait faciliter la réabsorption de l'eau dans les vasa recta...

Nous constatons que les cellules en culture qui expriment l'ARNm de Hyal2 sont essentiellement les cellules dites "I2". Ce terme est propre au laboratoire ; il ne recouvre pas de concept physiologique précis. Les cellules en culture dites interstitielles dans le présent travail sont isolées de la médullaire interne rénale au moyen d'un traitement à la collagénase, suivi d'une élimination des cellules du tubule collecteur puis d'une centrifugation sur gradient de Nycodenz. Les cellules I1 se retrouvent au-dessus des cellules I2. L'idée poursuivie, en effectuant ces préparations "purifiées" de cellules interstitielles

médullaires internes était d'isoler une sous-population de cellules qui représenterait le plus fidèlement possible les cellules interstitielles propres à la médullaire interne, et à elle seule. En effet, les tentatives effectuées jusqu'ici par d'autres groupes, ou les lignées de "cellules interstitielles médullaires" actuellement disponibles (Fontoura *et al*, 1990), ne reflètent pas strictement les caractéristiques des cellules in situ, probablement parce que la population de cellules interstitielles de la médullaire entière est hétérogène. Jusqu'à présent, les types cellulaires I1 et I2 n'ont été caractérisés que d'un point de vue morphologique et immunohistochimique ; la population de I2 semblait moins contaminée que celle de I1 par des cellules tubulaires, et son aspect se rapprochait plus des cellules interstitielles médullaires internes in situ, et moins des fibroblastes.

Les résultats que j'ai obtenus, à savoir une forte concentration d'ARNm d'hyaluronidase dans les cellules I2 par rapport aux cellules I1, pourraient constituer la première démonstration d'une différence fonctionnelle significative entre ces sous-groupes. S'ils se confirment lors d'expériences répétées, et surtout par des mesures d'expression et d'activité de la protéine, ils pourraient révéler une fonction jusqu'ici ignorée de ce type cellulaire.

Notons qu'un groupe d'investigateurs allemands a récemment publié une technique de purification de cellules interstitielles médullaires de rat qui se rapproche de celle suivie ici (Grupp *et al*, 1997).

5 Bibliographie

Bankir L., and de Rouffignac C. (1985) Urinary concentrating ability: insights from comparative anatomy. *Am J Physiol* **249**, R643-R666.

Bankir L., Bouby N., and Trinh-Trang-Tan M-M. (1989) The role of the kidney in the maintenance of water balance. *Baillieres Clin Endocrinol and Metab* **3**, 249-311.

Benoit E., Méry P.-F., Tacnet F., et Tell F. (1996) Histoires d'aquaporines: des canaux qui font couler beaucoup d'eau. *Médecine/Science* **12**, 787-794.

Bouaboula M., Legoux P., Pességué B., Delpech B., Dumont X., Piechaczyk M., Casellas P., and Shire D. (1992) Standardization of mRNA titration using a Polymerase Chain Reaction method involving co-amplification with a multispecific internal control. *J Biol Chem* **267**, 21830-21838.

Castor C.W., and Greene J.A. (1968) Regional distribution of acid mucopolysaccharides in the kidney *J Clin Invest* **47**, 2125-2132.

Chen M., Todd-Turla K., Wang W.-H., Cao X., Smart A., Brosius F.C., Killen P.D., Keiser J.A., Briggs J.P., and Schnermann J. (1993) Endothelin-1 mRNA in glomerular and epithelial cells of kidney. *Am J Physiol* **265**, F542-F550.

de Rouffignac C., et Bankir L. (1990) L'économie de l'eau chez les mammifères. *La Recherche* **21**, 654-665.

DeAngelis P.L., Jing W., Graves M.V., Burbank D.E., and Van Etten J.L. (1997) Hyaluronan synthase of chlorella virus PBCV-1. *Science* **278**, 1800-1803.

DeAngelis P.L., Papaconstantinou J., and Weigel P.H. (1993) Molecular cloning, identification, and sequence of the hyaluronan synthase gene from group A *Streptococcus pyogenes*. *J Biol Chem* **268**, 19181-19184.

Dobyan D.C., and Jamison R.L. (1984) Structure and function of the renal papilla. *Semin Nephrol* **4**, 5-26.

Engström-Laurent A., and Hellström S. (1990) The role of liver and kidneys in the removal of circulating hyaluronan. An experimental study in the rat. *Connect Tissue Res* **24**, 219-224.

Flamion B., Lacreman J., and Mertens-Strijthagen J. (1997) Effect of water intake on renal inner medullary hyaluronan (HA) and hyaluronidase. *FASEB J* **8**, 17A.

Flamion B., Mertens-Strijthagen J., and Boel P. (1998) Cloning of the cDNA for a rat hyaluronidase expressed in the kidney. *FASEB J* **12**, A423.

Fontoura B.M.A., Nussenzveig D.R., Pelton K.M., and Maack T. (1990) Atrial natriuretic factor receptors in cultured renomedullary interstitial cells. *Am J Physiol* **258**, C692-C699.

Frost G.I., Csoka T., and Stern R. (1996) The hyaluronisases: A chemical, biological and clinical overview. *Trends Glycosci Glycotechnol* **8**, 419-434.

- Frost G.I., Csoka T.B., Wong T., and Stern R.** (1997) Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase. *Biochem Biophys Res Commun* **236**, 10-15.
- Ginetzinsky A.G.** (1958) Role of hyaluronidase in the re-absorption of water in renal tubules: the mechanism of action of the antidiuretic hormone. *Nature* **182**, 1218-1219.
- Goggins J.F., Lazarus G.S., and Fullmer H.M.** (1968) Hyaluronidase activity of alveolar macrophages. *J Histochem Cytochem* **16**, 688-692.
- Grupp C., Lottermoser J., Cohen D.I., Begher M., Franz H.E., and Muller G.A.** (1997) Transformation of rat inner medullary fibroblasts to myofibroblasts in vitro. *Kidney Int* **52**, 1279-1290.
- Guyton A.C. and Hall J.E.** (1996) Regulation of Extracellular Fluid Osmolarity and Sodium Concentration. *Textbook of Medical Physiology*, 349-364.
- Hall J.E., Zappe D.H., Alonso-Galicia M., Granger J.P., Brands M.W., and Kassab S.E.** (1996) Mechanisms of obesity-induced hypertension. *News Physiol Sci* **11**, 255-261.
- Hays R.M.** (1992) Cell Biology of Vasopressin. *The Kidney*, pp. 424-444.
- Hughes A.K., Barry W.B., and Kohan D.E.** (1995) Identification of a contractile function for renal medullary interstitial cells. *J Clin Invest* **96**, 411-416.
- Itano N., and Kimata K.** (1996) Expression cloning and molecular characterization of HAS protein, a eukaryotic hyaluronan synthase. *J Biol Chem* **271**, 9875-9878.
- Jamison R.L., and Gerhig J.S.Jr.** (1992) Urinary Concentration and Dilution. *Handbook of Physiology - Renal Physiology*, 1233-1237.
- Kaissling B., Hegyi I., Loffing J., and Le Hir M.** (1996) Morphology of interstitial cells in the healthy kidney. *Anat Embryol* **193**, 303-318.
- Knepper M.A., and Rector F.C.Jr.** (1992) Urinary Concentration and Dilution. *The Kidney*, pp. 445-482.
- Knepper M.A., Danielson R.A., Saidel G.M., and Post R.S.** (1977) Quantitative analysis of renal medullary anatomy in rats and rabbits. *Kidney Int* **12**, 313-323.
- Knudson C.B., and Knudson W.** (1993) Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease. *FASEB J* **7**, 1233-1241.
- Knudson W.** (1996) Tumor-associated hyaluronan. Providing an extracellular matrix that facilitates invasion. *Am J Pathol* **148**, 1721-1726.
- Kreil G.** (1995) Hyaluronidases - A group of neglected enzymes. *Protein Science* **4**, 1666-1669.
- Lathrop W.P., Carmichael E.P., Myles D.G., and Primakoff P.** (1990) cDNA cloning reveals the molecular structure of a sperm surface protein, PH-20, involved in sperm-egg adhesion and the wide distribution of its gene among mammals. *J Cell Biol* **111**, 2939-2949.
- Laurent T.C., and Fraser J.R.E.** (1992) Hyaluronan. *FASEB J* **6**, 2397-2404.
- Law R.O., and Rowen D.** (1981) The influence of hyaluronidase on urinary and renal medullary composition following antidiuretic stimulus in the rat. *J Physiol* **311**, 341-354.

- Li M.-W., Yudin A.I., VandeVoort C.A., Sabeur K., Primakoff P., and Overstreet J.W.** (1997) Inhibition of monkey sperm hyaluronidase activity and heterologous cumulus penetration by flavonoids. *Biol Reprod* **56**, 1383-1389.
- Lin Y., Mahan K., Lathrop W.P., Myles D.G., and Primakoff P.** (1994) A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *J Cell Biol* **125**, 1157-1163.
- MacPhee P.J.** (1998) Estimating rat renal medullary interstitial oncotic pressures and the driving force for fluid uptake into ascending vasa recta. *J Physiol* **506**, 529-538.
- Mahadevan S., Dillard C.J., and Tappel A.L.** (1969) Degradation of polysaccharides, mucopolysaccharides, and glycoproteins by lysosomal glycosidases. *Arch Biochem Biophys* **129**, 525-533.
- Meyer K.** (1947) The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase *Physiol Rev* **27**, 335-359.
- Meyer K.** (1971) Hyaluronidases. *The Enzymes*, pp. 307-320.
- Meyer K. and Palmer J.W.** (1934) The polysaccharide in vitreous humor. *J Biol Chem* **107**, 629-634.
- Muirhead E.E.** (1991) The medullipin system of blood pressure control. *Am J Hypertens* **4**, 556S-568S.
- Nicoletti A., and Sassy-Prigent C.** (1996) An alternative quantitative polymerase chain reaction method. *Anal Biochem* **236**, 229-241.
- Pitcock J.A., Lyons H., Brown P.S., Rightsel W.A., and Muirhead E.E.** (1988) Glycosaminoglycans of the rat renomedullary interstitium: ultrastructural and biochemical observations. *Exp Mol Pathol* **49**, 373-387.
- Prehm P. (a)** (1983) Synthesis of hyaluronate in differentiated teratocarcinoma cells. Characterization of the synthase. *Biochem J* **211**, 181-189.
- Prehm P. (b)** (1983) Synthesis of hyaluronate in differentiated teratocarcinoma cells. Mechanisms of chain growth. *Biochem J* **211**, 191-198.
- Reed R.K., and Laurent U.B.G.** (1992) Turnover of hyaluronan in the microcirculation. *Am Rev Respir Dis* **146**, S37-S39.
- Rowen D., and Law R.O.** (1981) Renal medullary hexosamine content following antidiuresis and water-loading in the rat. Effects of antisera against rat urinary and testicular hyaluronidase. *Pflügers Arch* **390**, 152-155.
- Scott J.E.** (1989) Secondary structures in hyaluronan solution: chemical and biological implications. *The biology of hyaluronan*. Ciba Foundation Symposium, pp. 6-20.
- Scott J.E.** (1992) Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans in vitro and in the tissues. *FASEB J* **6**, 2639-2645.
- Smith** (1937) The physiology of the Kidney.
- Spicer A.P., and McDonald J.A.** (1998) Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family. *J Biol Chem* **273**, 1923-1932.
- Stamenkovic I., and Aruffo A.** (1994) Hyaluronic acid receptors. *Methods in Enzymology* **245**, 195-216.

Thomas C.J., Woods R.L., Evans R.G., Alcorn D., Christy I.J and Anderson W.P. (1996) Evidence for a renomedullary vasodepressor hormone *Clin Exp Pharmacol Physiol* **23**, 777-785.

Tisher and Madsen (1998) Anatomy of the kidney. *The kidney, 5 th edition on CD-ROM*.

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