



Association pour l'Information
et la Recherche sur les maladies
rénales Génétiques

FINANCEMENT DE PROJETS DE RECHERCHE PAR L'AIRG-SUISSE

Epigenetic regulation of genes involved in the development of chronic kidney disease and hypertension: endothelial progenitor cells dysfunction in a rodent model of intrauterine growth restriction

Pr Umberto SIMEONI, Dr Catherine ZYDORZYK

1. Montant alloué par l'AIRG-Suisse: 90.000CHF

2. Début du projet : octobre 2016

3. Etat des recherches au 31 décembre 2017 :

Les travaux effectués grâce à ce financement ont permis la mise en place et la validation du modèle expérimental murin utilisé pour le projet, et l'obtention de premiers résultats de recherche.

3-a : Mise en place du modèle animal et plan expérimental (voir annexe 1)

Nous avons mis en place un modèle expérimental animal chez le rat, caractérisé par un retard de croissance intrautérin (RCIU). Celui-ci est induit par une diète maternelle faible en protéines (9% caséine-groupe IUGR) vs. une diète contrôle (23% caséine-groupe CTRL) poursuivie durant toute la gestation (22 jours). À la naissance, les mères reçoivent une diète classique pour rongeur. Dès le 2^e jour de vie et durant toute la période de lactation (21jours), une condition expérimentale supplémentaire a été appliquée aux ratons issus de chaque groupe, par une modification du nombre de ratons dans la portée:

1) portées comportant un nombre normal de ratons, uniformisées à 10 ratons, définissant les groupes IUGR et CTRL

2) portées réduites à 4 ratons (2 mâles et 2 femelles), pour créer une suralimentation postnatale (overfeeding (OF)) due à une consommation plus importante, spontanée, de lait maternel, définissant les groupes IUGR-OF et CTRL-OF.

Les mâles et femelles de chacun des 4 groupes ont été étudiés, à ce stade des recherches, aux âges de 6 mois et un an.

À 6 mois, le nombre d'animaux est le suivant:

CTRL (8 mâles et 4 femelles) ; CTRL-OF (2 mâles et 2 femelles) ; LPD (8 mâles et 8 femelles) ; LPD+OF (3 mâles et 2 femelles).

À 12 mois le nombre d'animaux est le suivant:

CTRL (11 mâles et 6 femelles) ; CTRL-OF (2 mâles et 1 femelles) ; LPD (7 mâles et 12 femelles) ; LPD+OF (3 mâles et 4 femelles).

3-b : Paramètres mesurés

Sur ces animaux en croissance, les paramètres suivants ont été mesurés :

- 1) Le poids a été mesuré avec une périodicité hebdomadaire du 2^e jour de vie à l'âge d'un an.
- 2) Le nombre de glomérules du rein a été quantifié au 2^e jour de vie par méthode de digestion acide.
- 3) Des analyses biochimiques ont été effectuées aux âges de 6 mois et un an (les animaux ayant atteint l'âge adulte):

- **sur l'urine** récoltée en cage métabolique, nous avons mesuré les concentrations des : électrolytes (sodium, potassium, chlorure, calcium, phosphate), la créatinine, l'urée, l'urate, le glucose, les protéines totales, l'albumine.

- **sur le sang** récolté lors des sacrifices, nous avons mesuré les concentrations des électrolytes (sodium, potassium, chlorure, calcium, phosphate), la créatinine, l'urée, l'urate, le glucose, les protéines totales, l'albumine, la rénine et l'aldostérone.

4) La pression artérielle (tail cuff method) a été mesurée par la plateforme de génotypage cardiovasculaire (CAF).

5) La glomérulosclérose a été quantifiée sur les coupes histologiques (coloration au rouge sirius, logiciel Image J).

6) Nous avons étudié la fonction vasomotrice de l'aorte, en chambre d'organe, à 6 mois (au stade actuel des travaux) par les réponses à un vasoconstricteur, l'angiotensine II, et à deux vasodilatateurs : l'acétylcholine (endothélium-dépendant) et le nitroprussiate de sodium (endothélium-indépendant).

7) La vitesse de l'onde de pouls, témoin de la rigidité artérielle, a été mesurée à la CAF.

4. Résultats obtenus

4-a Poids des animaux (voir annexe 2)

Au 2^e jour de vie, le poids des animaux du groupe IUGR est significativement plus faible que celui des animaux du groupe CTRL, dans les deux sexes (avec une différence de – 48% chez les mâles ($p < 0.001$) et – 57% chez les femelles) ($p < 0.001$).

Cette différence persiste jusqu'à l'âge d'un an, mais s'amointrit (– 14% chez les mâles ($p > 0.05$) et – 22% chez les femelles ($p < 0.01$) à un an).

La surnutrition (OF) postnatale, induite par une réduction de la taille de la portée, conduit à l'âge d'un mois à un poids corporel plus élevé dans le groupe CTRL+OF vs. CTRL (+ 17% chez les mâles ($p > 0.05$) et + 7% chez les femelles ($p > 0.05$)). La différence est plus importante entre les groupes IUGR+OF vs. IUGR (+ 28% chez les mâles ($p < 0.01$) et + 23% chez les femelles ($p < 0.01$)). Cette différence persiste par la suite, excepté chez les femelles CTRL+OF, chez lesquelles le poids est plus faible que dans le groupe CTRL, à l'âge d'un an. Ces résultats dans les groupes OF doivent être confirmés vu le faible nombre d'animaux inclus dans ces groupes au stade actuel.

4-b Nombre de glomérules (voir annexe 3).

Au 2^e jour de vie le nombre de glomérules est plus faible dans le groupe IUGR vs. CTRL ($p < 0.04$).

4-c Analyses biochimiques

Ces analyses sont en cours de réalisation.

4-d Pression artérielle

La PA n'a pas pu être mesurée de façon optimale par la CAF. Une trop grande variabilité dans les mesures obtenues a été observée. Ce problème est en cours de traitement.

4-e Glomérulosclérose (voir annexe 4)

À l'âge d'un an, les premières quantifications (par le logiciel *Image J*) ont montré la présence d'une glomérulosclérose accrue dans le groupe IUGR vs. CTRL ($p < 0.02$) chez les mâles. Les images dans les groupes OF et chez les femelles sont en cours d'analyse de même que chez les animaux âgés de 6 mois.

4-f L'exploration de la vasomotricité à l'âge de 6 mois :

Une réponse accrue à l'angiotensine II, ainsi qu'une dysfonction endothéliale (défaut de relaxation à l'acétylcholine) ont été observées dans le groupe IUGR vs. CTRL. L'effet OF dans ces dysfonctions vasculaires est en cours d'analyse.

4-g La vitesse de l'onde de pouls

Les résultats sont en cours d'analyse.

5. Difficultés rencontrés-Solutions envisagées pour y remédier

-Animalerie

Nous avons subi un retard au lancement de notre modèle animal en raison de problèmes de contamination microbienne à l'animalerie du site « Bugnon 27 ».

Nous ne disposons à date que de relativement peu d'animaux dans les groupes OF, en conséquence de décès naturels d'animaux, et de difficultés de reproduction. Nous avons résolu ce dernier point en réalisant des frottis vaginaux pour nous assurer que les femelles se trouvent en période optimale pour chaque accouplement (pré-oestrus/oestrus).

Plus récemment nous avons rencontré des problèmes de « ring tail », conséquence d'une probable insuffisance hygrométrique au sein des locaux de l'animalerie. Cette difficulté a malheureusement conduit à sacrifier 3 portées. Une intervention technique est en cours pour résoudre ce problème.

-Mesure de la pression artérielle

Le personnel de la CAF rencontre beaucoup de difficultés à obtenir des résultats reproductibles par la méthode tail cuff. Plusieurs ajustements ont été effectués sans succès. Nous intervenons actuellement directement sur ce problème.

-Clairance de l'inuline.

Cette technique avait été mentionnée dans le projet initial mais ne pourra malheureusement pas être mise en place. Le protocole proposé dans ce projet était établi chez la souris. Nous avons essayé de l'adapter au rat mais nous avons rencontré des difficultés pour l'administration de l'inuline que nous n'avons pas su résoudre. Une alternative est en cours de réflexion.

-Elimination d'un time point.

Pour faciliter l'acquisition du nombre d'animaux en quantité suffisante et vu les difficultés rencontrées pour les obtenir, nous avons supprimé le time point 60 jours.

6. Collaborateurs-trices impliqué(e)s dans le travail jusqu'à présent:

-Dre Catherine Zydorczyk, PhD-MER1, est directrice expérimentale de ce modèle animal (référéncé VD3050 à la commission d'éthique). Elle est en charge de la réalisation de ce projet.

-Dr Christian Juvet, médecin assistant, est en charge de l'analyse des données biochimiques et de la quantification de la glomérulosclérose. Ce projet fait partie de son MD sous la supervision du Dr Hassib Chehade.

-Basile Kehavjee, étudiant en médecine, a effectué son Master de Médecine sur ce modèle animal. Il a analysé les poids des différents groupes et a travaillé sur la partie métabolique/hépatique (voir section 10).

-Katya Nardou, chercheur associée a quantifié le nombre de glomérules.

- Prof. Umberto Simeoni.

7. Plan des recherches pour la 2^e période avec mention de la date de fin probable du projet :

Mai à décembre 2018:

- Isolement des progéniteurs endothéliaux à partir du sang total et de la moelle osseuse;
- Finalisation des analyses biochimiques et de la quantification de la glomérulosclérose ;
- Mesure de la pression artérielle.
- Lancement des dernières portées pour compléter les différents groupes (visant n=10 par groupe/sexe) aux âges de 35, 180 et 360 jours.

Janvier à juin 2019:

-Caractérisation des progéniteurs endothéliaux :
Leur nombre, leurs propriétés angiogéniques régulées par des facteurs angiogéniques et antiangiogéniques, ainsi que l'étude de différents facteurs pouvant moduler l'angiogenèse tels que le stress oxydant, la sénescence seront étudiés.

-Identification des mécanismes épigénétiques :

La méthylation de gènes vasculaires clés, les histones déacétylase et les RNAs non codants pouvant réguler les fonctions angiogéniques des progéniteurs endothéliaux seront étudiés.

Juillet à septembre 2019 :

Analyse des données, rédaction de manuscrits.

Octobre 2019 :

Fin probable du projet.

8. Présentation des travaux en cours à des réunions scientifiques nationales ou internationales, avec résumé(s) publié(s) :

Aucunes publications en rapport direct avec ce projet n'ont été présentées.

Basile Keshavjee a présenté son travail de master lors de la journée de recherche du Département Femme Mère Enfants le 2 mars dernier, et un abstract sur les données métaboliques/hépatique a été soumis à l'*European Academy of Paediatric Societies* (Paris novembre 2018).

9. Publication(s) éventuelle(s):

Aucune publication n'a encore été rédigée sur ce travail en cours.

10- Ce financement a aussi permis :

L'exploration de la fonction métabolique à l'âge de 6 mois et un an:

Nous avons :

1) réalisé des tests de tolérance au glucose (injection intrapéritonéale de glucose), 2) mesuré la composition corporelle (tomodensitométrie), 3) effectué des analyses biochimiques sur du plasma permettant de mesurer les niveaux des transaminases (ALAT, ASAT), de la phosphatase alcaline, des enzymes pancréatiques (amylase, lipase), ainsi que des lipides (triglycérides, cholestérol, HDL-cholestérol) et de la protéine réactive C. 4) Des études histologiques sur le foie ont également été réalisées pour évaluer

la fibrose (trichrome de Masson), la stéatose (huile rouge), le stress oxydant (détection des anions superoxyde), la sénescence (noir soudan, beta-galactosidase).

Résultats :

Dès 6 mois de vie, nous avons observé chez les mâles et femelles dans le groupe IUGR vs. CTRL une intolérance au glucose, une augmentation de la quantité de graisse viscérale, une augmentation des transaminases, une dyslipidémie. Au niveau hépatique, une fibrose, une stéatose, une augmentation de la production d'anions superoxyde et de marqueurs de la sénescence sont également présents. Ces dysfonctions métaboliques et hépatiques sont accentuées dans le groupe IUGR+OF. Les analyses à l'âge d'un an sont en cours.

11- Date et signature :

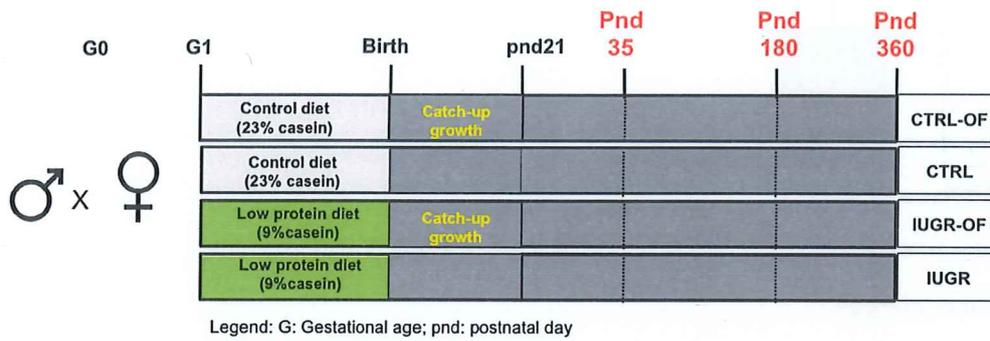
Le 17 avril 2018



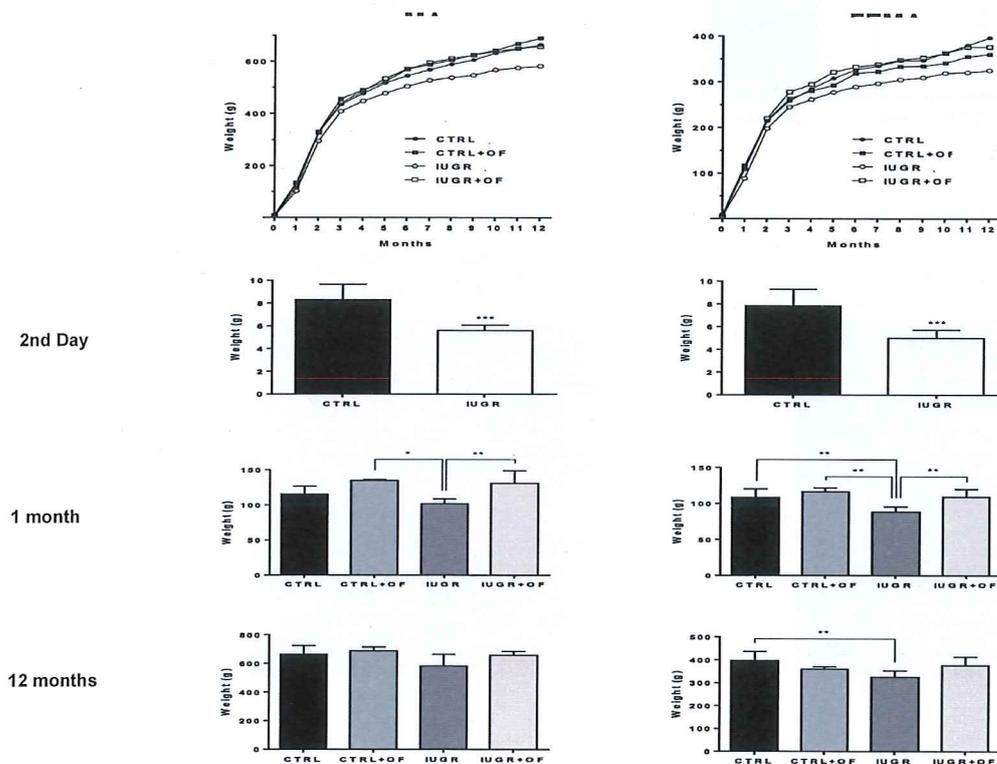
CHUV-HEL
Prof. Umberto SIMEONI
Chef de service
Service de pédiatrie - DFME

ANNEXES

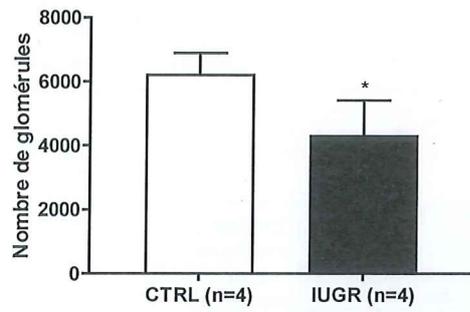
Annexe 1 : Plan experimental



Annexe 2 : Poids des animaux : courbes de croissance, comparaisons à un mois et un an (CTRL : contrôles ; IUGR : restriction de croissance intra-utérine ; overfeeding, suralimentation)



Annexe 3 : Nombre de glomérules par rein (CTRL : contrôles ; IUGR : restriction de croissance intra-utérine)



Annexe 4 : Glomérulosclérose

