N° d'ordre

UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE HOUARI BOUMEDIENE (U.S.T.H.B) ALGER

FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES

THESE DE DOCTORAT D'ETAT

Présentée à l'U.S.T.H.B pour l'obtention du grade de

DOCTEUR és SCIENCES NATURELLES
Physiologie Animale (Nutrition & Métabolisme)

Par Souhila AOUICHAT BOUGUERRA

RELATIONS DIABETE- ATHEROSCLEROSE : MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES MIS EN JEU PAR LA CULTURE DU MYOCYTE ARTERIEL DE *Psammomys obesus* DIABETIQUE

Soutenue publiquement le 07/ 11 / 2001 devant le jury :

M^me^ F. HADJ BEKKOUCHE, Professeur à l'U.S.T.H.B, Alger	Président
M^me^ Y. DAHMANI AÏT AKLI, Professeur à l'U.S.T.H.B, Alger	Directeur de thèse
M^elle^ MC. BOURDILLON, Professeur en Cardiologie, Lyon	Examinateur
M^elle^ Z. AMIRAT, Professeur à l'U.S.T.H.B, Alger	Examinateur
Mr A. BOUDIBA, Professeur en Sciences Médicales, CHU/Mustapha	Examinateur
Mr S. KHALFA, Professeur en Sciences Médicales, HCA/Aïn Naâdja	Examinateur
Mr K. KHALFAT, Professeur en Science médicales, CHU/Parnet	Examinateur

A la mémoire de mon père

A ma mère

A tous mes proches et amis

"Le monde véritable que la science nous révèle est de beaucoup supérieur au monde fantastique créé par l'imagination. On eût mis l'esprit humain au défi de concevoir les plus étonnantes merveilles, on l'eût affranchi des limites que la réalisation impose toujours à l'idéal, qu'il n'eût pas osé concevoir la millième partie des splendeurs que l'observation a démontrées."

Ernest RENAN

L'Avenir de la science.

Le sujet m'a été confié par M^{me} le professeur Y. DAHMANI-AÏT AKLI, qu'elle trouve ici ma reconnaissance et mes remerciements de la confiance qu'elle m'a témoignée pour mener à bien ce travail.

Ma reconnaissance et ma gratitude vont à M^{me} le Professeur F. BEKKHOUCHA pour m'avoir accueillie dans son équipe, guidée et conseillée ; son esprit scientifique est un exemple.

j'adresse ma profonde reconnaissance et mon amitié à M^{me} MC. BOURDILLON (Professeur en cardiologie, Chercheur à l'INSERM Unité 63 de Lyon) qui m'a initiée à la culture des myocytes artériels, je la remercie pour l'aide et le soutien qu'elle m'a toujours témoignés.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance et mes remerciements à M^{me} le Professeur F. HADJ BEKKOUCHE qui malgré toutes ses contraintes a accepté de présider ce jury et d'enrichir cette étude par sa critique.

A M^{me} le Professeur Z. AMIRAT, j'adresse ma gratitude et mon amitié pour s'être penchée avec autant d'intérêt sur ce travail tout au long de ces années. Je la remercie pour son engagement dans la critique de ce travail et sa présence dans le jury.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements et ma gratitude à Mr Le Professeur BOUDIBA (Chef de service de diabétologie de l'hôpital Mustapha) qui n'a pas hésiter d'accepter de juger ce travail.

J'exprime ma reconnaissance au Professeur KHALFA (Chef de service de diabétologie de l'hôpital Aïn Naâdja) qui a bien voulu m'accorder une partie de son temps pour examiner et juger ce travail.

Mes chaleureux remerciements vont à Mr le Professeur KHALFAT (Chef de service de Physiologie de l'hôpital Parnet) qui m'honore de sa présence dans ce jury en acceptant de juger ce travail.

Je dirai toute mon amitié et ma reconnaissance à M^{me} T. GERNIGON (Pr), M^{elle} Y. BENAZZOUG (MC) ainsi que M^{elle} B. DIERDIOURI (MC) pour m'avoir, sans compter, prodiguée conseils, critiques et aide.

Toute ma gratitude va à mes collègues et amies : M^{me} F. EL LEMDANI, M^{me} Z. HAMOULI, M^{me} K. OTHMANI, M^{me} S. BOUDERBA, Mr F. BOUKHROUFA. Pour avoir fait montre de tant de disponibilité, d'aide et de dévouement, infiniment merci.

Mes sincères remerciements et ma gratitude vont également à mes amis du laboratoire d'immunologie en particulier M^{elle} S. MOUHOUB et Mr A HABBACHE. Il me sera difficile d'oublier de remercier M^{me} S. BOURAOUD, Technicienne dans le laboratoire de virologie de l'Institut Pasteur de Sidi Fredj.

Je tiens également à adresser mes vifs remerciements à M^{me} R. HOUASSINE, M^{elle} O. BOUZAR et M^{me} BENDHIF pour leur gentillesse et leur disponibilité. Ma gratitude va également au Pr T. BOUGUERRA pour son aide et tous les services rendus.

Je ne saurai oublier les collègues de l'équipe de Nutrition, du module de TCB et ceux de la FSB pour leur soutien et leur amitié ainsi que le personnel de la station de Beni Abbès pour leur disponibilité et leur sollicitude.

Enfin, mes remerciements vont à mon époux et mes enfants qui ont fait preuve d'un dévouement inlassable au cours de ces dix années, si éprouvantes. Qu'ils trouvent ici l'assurance de mon affection et de ma reconnaissance.

SOMMAIRE

INTRODUCTION 8

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES 11

I. LESIONS ASSOCIEES AU DIABETE 12
II. NOUVEAUX CONCEPTS CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DE L'ATHEROSCLEROSE 14
III. MATRICE EXTRACELLULAIRE 16
A. LES COLLAGENES 18
١. Structure moléculaire
٢. Etapes de la biosynthèse
٢,١. *Organisation des gènes*
٢,٢. *Transcription*
٢,٣. *Traduction*
٢,٤. *Modifications post traductionnelles*
٢,٥. *Formation de la triple hélice et sécrétion du procollagène*
٢,٦. *Traitement extracellulaire*
٢,٧. *Fibrillogenèse*
B. LA GLYCATION 24
C. RELATION CELLULE - MATRICE 26
IV. CHOLESTEROL INTRACELLULAIRE 29
A. LES MARQUEURS DE L'ATHEROGENICITE 29
١. Lipoprotéines à Apo AI et AII
٢. Lipoprotéines à Apo B
B. VOIES ENZYMATIQUES DU CHOLESTEROL 36
١. Voie exogène de distribution
٢. Voie endogène de distribution
٣. Voie exogène de rejet
٤. Voie endogène de rejet
C. OXYDATION DES LDL 38
D. REGULATION ET THERAPEUTIQUE 41

MATERIEL ET METHODES 43

MATERIEL BIOLOGIQUE 44
I. RAT DE LABORATOIRE (*Rattus norvegicus*) 44
١. Origine de *Rattus norvegicus* normal
٢. Evolution du diabète insulino dépendant chez *Rattus norvegicus*

II. RAT DES SABLES (*Psammomys obesus*) 45
١. Origine de *Psammomys obesus* normal
٢. Evolution du diabète non insulino dépendant chez *Psammomys obesus*

METHODES 47
I. CULTURE CELLULAIRE 47
A. MISE EN CULTURE DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES AORTIQUES
B. CONSERVATION DES CELLULES

II. ETUDE MORPHOMETRIQUE 52
A. PRINCIPE
B. PREPARATION DES CELLULES

III. ETUDE BIOCHIMIQUE 52
A. CHOLESTEROL 52
١. Principe
٢. Réactifs
٣. Extraction des lipides
٤. Cholestérol libre
٥. Cholestérol total
٦. Cholestérol estérifié
B. QUANTIFICATION DES PROTEINES ET DES COLLAGENES TOTAUX 56
١. Principe
٢. Réactifs
٣. Dosage

IV. ETUDE DE LA BIOSYNTHESE DES PROTEINES ET DES COLLAGENES TOTAUX 56
A. PREPARATION DES CML
B. DETERMINATON DE LA RADIOACTIVITE TOTALE DANS LES PROTEINES ET LES COLLAGENES TOTAUX
C. EXPRESSION DES RESULTATS

V. TYPAGE DES COLLAGENES 58
A. PRINCIPE
B. PREPARATION DES ECHANTILLONS
C. PREPARATION DES GELS
D. CONDITION D'ELECTROPHORESE
E. DETERMINATION DE LA RADIOACTIVITE DES CHAINES α1 ET α2 DES COLLAGENES I ET III

VI. PROCEDE IMMUNOLOGIQUE 61
A. IMMUNISATION
B. PRECIPITATION EN MILIEU LIQUIDE
C. ELECTROSYNERESE
١. Principe
٢. Procédé
D. IMMUNOBLOTTING
١. Electrophorèse
٢. Transfert
٣. Détermination des poids moléculaires
٤. Marquage spécifique
٥. Révélation
E. ABSORBANCE

VII. EFFETS DU GLUCOSE A CONCENTRATIONS ELEVEES SUR LES CML EN CULTURE **67**
VIII. INFLUENCE DE L'INSULINE **67**
IX. ANALYSE STATISTIQUE **69**

RESULTATS **70**

CHAPITRE I :
EVOLUTION DES CML AORTIQUES EN CULTURE ET ANALYSE MORPHOMETRIQUE **71**

EVOLUTION DES CML AORTIQUES EN CULTURE **72**
I. PROLIFERATION DES CML EN CULTURE PRIMAIRE
II. PROLIFERATION DES CML EN CULTURE SECONDAIRE

MORPHOMETRIE **77**
I. LONGUEURS CELLULAIRES MAXIMALES **77**
A. ETAT BASAL
B. EFFET DE CONCENTRATIONS ELEVEES DE GLUCOSE A COURT ET LONG TERME
C. EFFET DES DIABETES NID ET ID
D. INFLUENCE DE L'INSULINE

II. LONGUEURS NUCLEAIRES MAXIMALES **82**
A. ETAT BASAL
B. EFFET DE CONCENTRATIONS ELEVEES DE GLUCOSE A COURT ET LONG TERME
C. EFFET DES DIABETES NID ET ID
D. INFLUENCE DE L'INSULINE

III. NUMERATION DES NUCLEOLES **83**
A. ETAT BASAL
B. EFFET DE CONCENTRATIONS ELEVEES DE GLUCOSE A COURT ET LONG TERME
C. EFFET DES DIABETES NID ET ID
D. INFLUENCE DE L'INSULINE

IV. CONCLUSION **86**

CHAPITRE II :
ETUDE DE LA BIOSYNTHESE DES PROTEINES ET DES COLLAGENES TOTAUX PAR LES CML AORTIQUES EN CULTURE **87**

I. ETUDE DE LA BIOSYNTHESE DES PROTEINES TOTALES **89**
A. ETAT BASAL
B. EFFET D'UNE INCUBATION AU GLUCOSE A COURT ET LONG TERME
C. EFFET DES DIABETES NID ET ID
D. INFLUENCE DE L'INSULINE

III. ETUDE DE LA BIOSYNTHESE DES COLLAGENES TOTAUX **100**
A. ETAT BASAL
B. EFFET D'UNE INCUBATION AU GLUCOSE A COURT ET LONG TERME
C. EFFET DES DIABETES NID ET ID

D. INFLUENCE DE L'INSULINE

CHAPITRE III :
QUELQUES ASPECTS IMMUNOLOGIQUES ET BIOSYNTHESE DES CHAINES α1 ET α2 DES COLLAGENES I ET III PAR LES CML AORTIQUES EN CULTURE **11**
I. QUANTIFICATION DES CHAINES α1 ET α2
114
II. PROCEDE IMMUNOLOGIQUE
120
A. ANTICORPS ANTI COLLAGENE I ET III
B. IMMUNOBLOTTING
١. Chaînes α1 et α2 du collagène I
٢. Chaînes α2 du collagène I
٣. Chaînes α1 du collagène III

III. BIOSYNTHESE DES COLLAGENES I et III
125
A. ETAT BASAL
B. EFFET DE CONCENTRATIONS ELEVEES DE GLUCOSE A COURT ET LONG TERME
C. EFFET DES DNID ET DID
D. INFLUENCE DE L'INSULINE
E. CONCLUSION

CHAPITRE IV :
EVALUATION DES FRACTIONS DE CHOLESTEROL LIBRE, TOTAL ET ESTERIFIE DANS LES CML AORTIQUES EN CULTURE SECONDAIRE **143**
I. ETAT BASAL
II. EFFET DE CONCENTRATIONS ELEVEES DE GLUCOSE A COURT ET LONG TERME
III. EFFET DES DNID ET DID
IV. INFLUENCE DE L'INSULINE
V. CONCLUSION

DISCUSSION **145**

CONCLUSION GENERALE **167**

BIBLIOGRAPHIE **171**

ANNEXES **207**

INDEX **217**

LISTE DES ABREVIATIONS

+ G 48h	: + glucose pendant 48 heures
+ G 4P	: + glucose durant 4 passages
+ G 4P + Ins	: + glucose durant 4 passages + insuline
µCi	: Microcurie
µm	: Micromètre
4P	: 4ème passage
5HT	: Histamine
Ac	: Anticorps
Ac anti coll I	: Anticorps anti collagène I
Ac anti coll III	: Anticorps anti collagène III
ACAT	: Acyl-CoA cholesterol acyl transferase
Ag	: Antigène
AGEs	: Advanced glycosylation end products
AMPc	: Adénosine Monophosphate cyclique
ANG	: Angiotensine
Apo	: Apoprotéine
Apo (a)	: apoprotéine a
Apo B 100	: apoprotéine B 100
C	: Contractile
CE	: Cholestérol estérifié
CEC	: Compartiment extrcellulaire
CE-HDL	: Cholestérol estérified-HDL
CETP	: Cholesterol ester transfert protein
CIC	: Compartiment intracellulaire
CL	: Cholestérol libre
CML	: Cellule musculaire lisse
CMLc	: Cellule musculaire lisse contractile
CMLs	: Cellule musculaire lisse synthétique
Coll I	: Collagène I
Coll III	: Collagène III
cpm	: Coups par minute
CT	: Cholestérol total
Diab	: Diabétique
Diab + Ins	: Diabétique + insuline
DID	: Diabète insulino dépendant
DMEM	: Milieu Essentiel de Eagle modifié par Dubelco
DMSO	: Dimethyl Sulfoxide
DNID	: Diabète non insulino dépendant
EDGF	: Endothelium Derived Growth Factor
EDIF	: Endothelium Derived Inhibiting Factor
EDTA	: Ethylenediamine tetraacetic acid
FGF	: Fibroblast Growth Factor
GAG	: Glycosaminoglycannes
GLUT	: Glucose transporter
HDL	: High Density Lipoprotein (Lipoprotéine de haute densité)
HMG CoA	: 3-hydroxy-3méthylglutaryl coenzyme A
HS	: Héparan sulfate
HTA	: Hypertension artérielle
I ou Ins	: Insuline
IDL	: Intermediate Density Lipoprotein (Lipoprotéine de densité intermédiaire)
IGF	: Insulin like Growth Factor
IL-1 (2, 3 4, 10)	: Interleukine-1 (2, 3, 4, 10)
INF γ	: Interféron Gamma
LCAT	: Lecithin cholesterol acyl transferase
LDL	: Low Density Lipoprotein (Liprotéine de faible densité)
LDLR	: LDL receptor
Lp (a)	: Lipoproteine (a)
MCP-1	: Monocyte chemotactic molecule
MCSF	: Macrophage colony stimulating factor

MDGF	: Macrophage Derived Growth Factor
MEC	: Matrice extracellulaire
MG	: α Macroglobuline
mM	: millimolaire
MM - LDL	: Minimised modified LDL
MM-LDL	: Minimized modified LDL
mRNA	: Acide ribonucléique messager (messenger Ribonucleic Acid)
mU	: milliunité
NCE	: Neutral cholesterol esterase
Ox - LDL	: Oxidized LDL
P.o	: Psammomys obesus
PAGE	: Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PDGF	: Platelet Derived Growth Factor
PDGF Like	: Platelet Derived Growth Factor Like
PG	: Protéoglycannes
PGE_2	: Prostaglandine E_2
PGI_2	: Prostaglandine I_2
R.n	: Rattus norvegicus
REG	: Réticulum endoplasmique granuleux
S	: Synthétique
SDGF	: Smooth muscle Derived Growth Factor
SDS	: Sodium Dodecylsulfate
SGLT	: Sodium Glucose Transporter
SnuRP	: Small Nuclear ribonucleoprotein
TNF	: Tumor Necrosing Factor
VLDL	: Very Low Density Lipoprotein (Liprotéine de très faible densité)
X-LAM	: X-Lymphocyte adhesion molecule

INTRODUCTION

Les travaux de ce mémoire se situent dans le cadre de recherches conduites dans notre laboratoire et concernent les approches cellulaires et moléculaires de l'étude du diabète non insulino dépendant (DNID) chez le rat des sables (*Psammomys obesus*) et le diabète insulino dépendant (DID) chez le rat de laboratoire (*Rattus norvegicus*) ainsi que les influences pharmacologiques.

Le problème de la pathogénie diabétique reste d'une grande complexité et les nombreux modèles expérimentaux étudiés pour élucider l'origine des perturbations tant métaboliques qu'anatomo - pathologiques n'ont permis d'explorer qu'un ou certains facteurs intervenant dans le processus évolutif de la maladie, multifactorielle par excellence. Néanmoins, le diabète avec l'athérosclérose font partie de ces pathologies appelées « maladies de la sénescence ». Elles sont d'une part la cause d'une détérioration progressive de la charpente fibreuse de l'organisme avec toutes ses conséquences pathologiques (Robert et Robert, 1970 ; Robert, 1971) et d'autre part le résultat d'une infiltration des lipides notamment les lipoprotéines de basse densité ou LDL (Ross et Glomset, 1976).

Les travaux antérieurs menés au sein de notre laboratoire ont révélé tout l'intérêt de *Psammomys obesus* comme modèle potentiel du diabète expérimental. Ils ont montré qu'il développe un diabète spécifique d'origine nutritionnelle lors d'une surcharge calorique ; l'apparition et le développement des différents stades de la pathogénie diabétique aboutissant au stade ultime de la maladie avec un coma acidocétosique sont parfaitement reproductibles (Marquié *et al.*, 1980a ; 1982 ; 1984 ; Bouderba, 1985 ; Bouguerra, 1985 ; Khemici, 1985 ; Koceir, 1985 ; Belarbi, 1990 ; Khalkhal, 1990 ; Zelmat, 1990). Les études portant sur la morphologie, l'histochimie, l'ultrastructure et la biochimie de différents organes comme le tissu adipeux et le pancréas (Dahmani *et al.*, 1980 ; Dahmani, 1981 ; El Lemdani, 1991), le rein et la peau (Benazzoug, 1981 ; Othmani Mecif, 1989), l'aorte et le foie (Mahtout, 1981 ; Koceir, 1985) ont permis de confirmer les différents états pathologiques du diabète chez *Psammomys obesus* et de montrer que ce dernier répond de façon spectaculaire à la thérapeutique antidiabétique nutritionnelle (Bouderba, 1985) et pharmacologique (Bouguerra, 1985 ; Khemici, 1985).

Afin de mieux comprendre la pathogénie diabétique chez *Psammomys obesus*, les travaux du laboratoire explorent des domaines cellulaires et moléculaires axés sur la lymphoprolifération (Lahfa, 1995), la physiologie de l'hépatocyte isolé (Koceir *et al.*, 2000), l'immunocytochimie des surrénales et de l'hypophyse (Omari *et al.*, 1996) et l'immunophysiologie des îlots de Langerhans (Khalkhal *et al.*, 1992).

Au sein de ce travail pluridisciplinaire, l'aspect de l'aorte explorée in vivo au stade de l'obésité, du DNID et au stade ultime de la maladie chez *Psammomys obesus* a montré des modifications importantes de la média et de l'intima sur le plan morphologique et histoenzymologique (Mahtout, 1981 ; Bouderba, 1985 ; Bouguerra, 1985 ; Khemici, 1985) ainsi qu'ultrastructural (Mahtout, 1981), signes d'une macroangiopathie aggravée. En effet, le processus athéroscléreux se produit plus précocement et sous sa forme la plus sévère au cours du diabète. Ce dernier, facteur de risque majeur de l'athérosclérose en accélère les mécanismes qui favorisent son développement (West, 1978 ; Keen et Jarret, 1982 ; Andresen *et al.*, 1996). Pour cette raison, le diabète est considéré comme une maladie des lames basales (Robert, 1971), de la paroi vasculaire et du tissu conjonctif en général (Robert *et al.*, 1976).

Ces réalités justifient l'intérêt que nous avons porté aux relations existant entre le diabète et l'athérosclérose chez ce modèle. Aussi, dans le cadre de notre travail qui concerne une approche cellulaire des mécanismes mis en jeu au cours de la pathogénie athéroscléreuse diabétique, nous nous sommes particulièrement intéressés à la cellule musculaire lisse aortique (CML) en culture secondaire, cette dernière étant fortement impliquée dans le développement de la pathogénie athéroscléreuse (Ross, 1971 ; Bourdillon *et al.*, 1977 ; Campbell et Chamley Campbell., 1981).

Les dérégulations physiologiques de cette cellule intervenant au cours du processus athéroscléreux incriminent plusieurs molécules liées à l'activité cellulaire mais aussi à celle de la matrice extracellulaire comme le cholestérol (Campbell *et al.*, 1983), les collagènes, la fibronectine, les protéoglycannes... (Robert et Robert, 1985).

Il est bien établi que l'athérosclérose est une maladie des plus menaçantes car responsable d'une forte mortalité en particulier dans les pays développés (Brown et Goldstein, 1985 ; Turpin, 1989) et les dérégulations intervenant au cours du processus athéroscléreux, aggravées par le diabète, mettent en jeu plusieurs molécules (Ross, 1992 ; 1993) dont le cholestérol et les collagènes. Aussi, nous avons choisi d'étudier l'activité du cholestérol intracellulaire et les variations de biosynthèse des collagènes au cours du diabète ; ces deux molécules étant d'excellents marqueurs respectivement des compartiments intra- et extracellulaires des cellules vasculaires. En effet, le cholestérol est considéré comme un facteur majeur dans le déclenchement de la pathogénie athéroscléreuse car il intervient dans la modulation phénotypique de la CML, dans sa prolifération et sa transformation en cellule spumeuse. Celle-ci bourrée d'esters de cholestérol «foam cell» caractérise les plaques athéroscléreuses tardives (Ross et Glomset, 1976 ; Ross, 1986).

Les collagènes quant à eux sont des macromolécules clefs de la matrice extracellulaire (MEC) qui exerce un effet de rétro-régulation sur la cellule qui la produit. Entre cellule et MEC existe un véritable circuit à deux voies : l'une correspondant à la synthèse et la sécrétion des macromolécules, l'autre permettant à la MEC de recontacter la cellule "*via"* des récepteurs spécifiques reliés au cytosquelette dont les intégrines (Lee *et al.*, 1995). Le programme de synthèse de ces macromolécules subit de grandes variations et modifications tant qualitatives que quantitatives dans certains états pathologiques tels l'athérosclérose (Day et Milles, 1978 ; Robert et Labat Robert, 1989). Le diabète est une des maladies aggravant les dérégulations du programme de synthèse de la MEC et celles de la relation MEC – cellule provoquées par l'athérosclérose (Brownlee *et al.*, 1988).

A ce jour, aucune étude *"in vitro"* n'a été réalisée sur les CML aortiques de P.o ; la première étape de ce travail a donc concerné la mise au point de la technique de culture de ces cellules chez P.o normal et à l'état du DNID. Une étude comparative a été effectuée sur les CML aortiques de rat de Laboratoire *Rattus norvegicus* rendu diabétique insulinoprive par la streptozotocine.

Sur les animaux en expérience, (rats de laboratoire et rats des sables répartis en lots témoins et lots diabétiques), nous avons suivi in vivo l'évolution et le développement des troubles métaboliques par des examens analytiques appropriés (teneurs plasmatiques en glucose, lipides et insuline).

Nos investigations *"in vitro"* ont été réalisées sur les CML aortiques de R.n et P.o dans différentes conditions expérimentales :

- Le passage précoce de la subculture (4ème passage) afin d'éviter toute interférence avec le vieillissement des cellules
- L'état phénotypique (contractile et synthétique) pour l'étude de la modulation cellulaire
- L'influence du glucose à fortes concentrations (15 mM équivalents à 3 g/l) à court terme (48h) et long terme (4P) afin de mimer un état diabétique
- L'influence des diabètes non insulino dépendant chez P.o et insulino dépendant chez R.n
- L'influence de l'insuline à faible dose (4 mU/ml) pendant 48h sur les CML synthétiques incubées à long terme dans un milieu enrichi en glucose et sur les CML synthétiques de R.n et P. o respectivement diabétiques NID et ID.

Le travail que nous avons développé a porté tout d'abord sur l'évolution et la modulation des CML aortiques en culture primaire et secondaire avec l'étude de quelques paramètres morphométriques dans les différentes conditions expérimentales que nous avons cité ci-dessus.

Cette étude a également consisté en l'analyse des variations du cholestérol libre et estérifié contenus dans les CML en subculture lors de la modulation cellulaire, sous l'effet de concentrations élevées de glucose et au cours du diabète.

Parallèlement à ces investigations, nous avons observé l'évolution des dérégulations de la biosynthèse des protéines et des collagènes totaux ainsi que leur production et sécrétion dans le compartiment extracellulaire.

Dans cette partie, nous avons entrepris certains aspects immunologiques des chaînes α des collagènes I et III par une mise en évidence des anticorps anti collagène I et anti collagène III ainsi que leurs sites antigéniques correspondants situés sur les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du collagène I et les chaînes $\alpha 1$ du collagène III, à l'état normal et dans les conditions de pathologie.

Nous avons complété ce volet par l'estimation et l'analyse des variations de la biosynthèse des collagènes I et III aux deux états phénotypiques, sous l'effet de concentrations élevées de glucose et au cours du diabète.

Enfin, nous avons envisagé une analyse hormonale à l'insuline dans un but thérapeutique. Pour cela nous avons additionné, au milieu d'incubation des CML synthétiques uniquement, de l'insuline à très faible dose (4 mU/ml) durant 48h puis évalué les différents paramètres cités précédemment que nous nous sommes proposés d'étudier.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I. LESIONS ATHEROSCLEREUSES ASSOCIEES AU DIABETE

Les lésions désignées par le terme d'athérosclérose correspondent à des modifications macroscopiquement visibles de l'intima-média des artères élastiques (Berry, 1987 ; Benditt, 1987 ; 1988). Cette désignation implique au moins deux types de mécanismes qui caractérisent la maladie : la rigidification progressive (sclérose) et la formation de dépôts lipidiques ou athéromes (Robert, 1993 ; Libby *et al.*, 1996).

L'athérosclérose est une atteinte de l'intima qui s'épaissit en raison de l'accumulation des macromolécules de la MEC ainsi que des cellules (Ross, 1971; Rosenfield et Ross, 1990 ; Fülöp *et al.*, 1998). Celles impliquées dans les lésions typiques des artères sont les CML, les cellules endothéliales, les monocytes (Robert, 1985 ; Ross, 1986 ; Luscher *et al.*, 1995 ; Ylä Hertuala, 1994) et les lymphocytes (Ross, 1992 ; Fülöp *et al.*, 1998). L'athérosclérose correspond à un processus multifonctionnel complexe (Stary *et al.*, 1995) résultant d'une réponse inflammatoire / prolifération excessive, à des agressions variables de la paroi artérielle (Fuster *et al.*, 1992 ; Holvo et Collen, 1997). Selon Ross (1986), Stary *et al.*, (1995), la lésion initiale de l'intima riche en lipoprotéines est marquée par un épaississement (Fig.1). La lésion secondaire consiste en un dépôt de lipides dans les CML et les macrophages, incluant ainsi les lésions appelées stries lipidiques. La lésion de type III contient de plus des lipides extracellulaires. La lésion de type IV est caractérisée par la confluence des lipides extracellulaires et par une synthèse importante de la MEC. La lésion de type V présentant des fissures est souvent calcifiée et la lésion de type VI correspond à la thrombose.

Par des techniques immunocytochimiques, Ross (1992) ainsi que Vander Wal *et al.*, (1994a) étudient la distribution des CML, du collagène et des cellules inflammatoires (macrophages et lymphocytes) dans les plaques avancées d'aorte et de carotide et ont ainsi déterminé des lésions dites fibreuses riches en collagène et CML, des lésions lipidiques dominées par les macrophages et les lymphocytes et des lésions qui sont à la fois fibreuses et lipidiques.

Dans les lésions d'athérosclérose précoce, les lipides extracellulaires sont au voisinage des macrophages spumeux lesquels après leur adhésion à l'endothélium envahissent la sous intima (Gotto et Paoletti, 1986 ; Ross, 1986), internalisent et métabolisent des lipides, libèrent protéases, apoprotéines et mitogènes (Clarke *et al.*, 1987) et altèrent l'expression du gène des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du procollagène (Halloram *et al.*, 1997). Dans les lésions plus avancées, la mort des macrophages contribue à augmenter le taux des lipides extracellulaires (Ball *et al.*, 1995). La morphologie des plaques athéroscléreuses varie donc des lésions fibreuses considérées comme essentiellement stables (Davies *et al.*, 1985 ; Thomas *et al.*, 1992 ; Weissberg *et al.*, 1996) aux lésions riches en lipides avec athéromes proches de la rupture (Jacotot, 1993 ; Robert, 1993). A ces lésions sont associées de nombreuses cellules spumeuses (Rosenfield et Ross, 1990).

Les risques cardiovasculaires sont 4 à 6 fois plus aggravés chez les patients DNID (Abott *et al.*, 1988). Ceux-ci marqués par une hyperinsulinémie et une insulinorésistance, présentent une altération des carbohydrates et du métabolisme des lipides résultant de l'hyperglycémie, une augmentation des VLDL et des LDL ainsi qu'une diminution des HDL (Brown et Goldstein, 1984 ; Leuteneger et Bertin 1995, Schneider et Sobel, 1997). Les traditionnels risques cardiovasculaires (hypercholestérolémie, diabète, HTA) sont liés au dysfonctionnement endothélial (Vogel, 1997). Les grandes fonctions endothéliales et particulièrement la capacité de contrôler la vasoconstriction artérielle vont être touchées (Bonnet, 2001). Du point de vue moléculaire, les causes sont souvent multiples et imparfaitement comprises telles l'augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales

par prolifération (Resnick *et al.*, 2000), l'excès plasmatique en LDL, leur accumulation extra- puis intracellulaire dans la sous intima (Allen, 1998) ainsi que la progression de leur oxydation qui joue un rôle déterminant dans l'induction du dysfonctionnement endothélial (Schultz *et al.*, 2000). Les risques cardiovasculaires sont également liés à l'exagération de la prolifération des CML qui est une anomalie clef dans le développement de l'athérosclérose diabétique (Hadrava *et al.*, 1990 ; Schneider et Sobel, 1997) ainsi qu'aux modifications biochimiques du tissu conjonctif (Andreassen *et al.*, 1981). Aussi, la mortalité due à l'athérosclérose coronaire est plus élevée chez les diabétiques (Gabay, 1975 ; Goldstein, 1984 ; Lesobre, 1994).

Une meilleure compréhension des mécanismes de l'athérogenèse et l'élaboration d'une stratégie anti-athéroscléreuse imposent à ce jour le recours à la méthode expérimentale laquelle met en jeu soit les modèles animaux "*in vivo*" (Lofland *et al.*, 1960 ; 1965 ; Hadjiisky *et al.*, 1991) soit les modèles cellulaires (Ross, 1971 ; Flower *et al.*, 1977 ; Faris *et al.*, 1992).

Les modèles "*in vivo*" sont utilisés pour reproduire chez l'animal des lésions de type athéroscléreux, analyser leur régression éventuelle et apprécier le rôle des facteurs génétiques, diabétiques, ainsi que des agents pharmacologiques.

L'étude de ces modèles a permis de distinguer deux groupes d'animaux : les athérorésistants et les athérosensibles. Les premiers sont indemnes d'athérosclérose et ne répondent pas ou répondent mal aux procédés athérogènes (chien, cobaye, rat, souris). Les seconds développent une athérosclérose spontanée : quelques oiseaux (pigeon, oie) et mammifères (porc, singe) entrent dans cette catégorie (Hadjisky *et al.*, 1979 ; 1980 ; Phillip *et al.*, 1988). Le rat des sables (*Psammomys obesus*) est un rongeur déserticole original par le diabète non insulino dépendant qu'il développe et les complications dégénératives qui en résultent ; ce qui met en exergue le choix du modèle de diabète mais aussi le modèle d'athérosclérose expérimentale et de prolifération intimale (Marquié *et al.*, 1980a ; 1984 ; 1991).

Grâce aux cultures cellulaires dont celles des CML, des avancées considérables ont pu être réalisées dans le domaine de la biologie cellulaire et moléculaire de l'athérosclérose (Mc Guire *et al.*, 1993) . Elles concernent essentiellement :

- Les interactions cellules – cellules, cellules – matrice.
- Les biosynthèses cellulaires (macromolécules, messagers, récepteurs)
- La réponse des CML aux facteurs activateurs et inhibiteurs de prolifération et ou de migration, aux lipides, ainsi qu'aux agents pharmacologiques (Campbell et Campbell, 1987, Desgranges et Larrue, 1990).

D'origine mésenchymateuse, la CML artérielle est une cellule, transformable et modulable (Bourdillon *et al.*, 1976a ; 1976b ; Chamley Campbell *et al.*, 1981 ; Campbell et Campbell, 1985). Au cours de l'ontogenèse, la CML évolue d'un état synthétique sécrétoire à un état contractile mature (Clarkson *et al.*, 1987 ; Hadjiisky *et al.*, 1980, 1991). Chez l'adulte, spontanément ou sous l'effet de stimuli, les CML s'activent et changent de phénotype avec passage inverse d'un état contractile sessile à un état synthétique prolifératif (Campbell *et al.*, 1987 ; Godeau, 1990 ; Tabacik *et al.*, 1991 ; Thyberg *et al.*, 1995), elles s'engagent alors dans des divisions répétées (Schwaitz *et al.*, 1986) et synthétisent une matrice extracellulaire désordonnée, non conforme au programme d'entretien à l'état quiescent. (Robert, 1993 ; Ruckman *et al.*, 1994). Elles subissent une migration de la média vers l'intima où elles sont maintenues à l'état prolifératif sous l'influence du collagène I notamment alors que l'élastine les maintient à leur état contractile dans la média (Yamamoto *et al.*, 1993).

En culture, la CML présente des analogies avec celle observée dans les lésions d'athérosclérose. De façon similaire, elle perd spontanément ses capacités de contraction et accroît ses capacités de sécrétion (Chamley Campbell *et al.*, 1979 ; Bourdillon *et al.*, 1991). Elle devient sensible aux stimuli mitogènes, apte à proliférer et à capter des lipoprotéines, capable de produire des facteurs stimulant sa propre croissance et attirant les monocytes (Bourdillon *et al.*, 1989, Desgranges et Larrue, 1990). La modulation phénotypique des CML est donc marquée par des modifications morphologiques, biochimiques, métaboliques et fonctionnelles (Hadjiisky *et al.*, 1991 ; Bourdillon *et al.*, 1991).

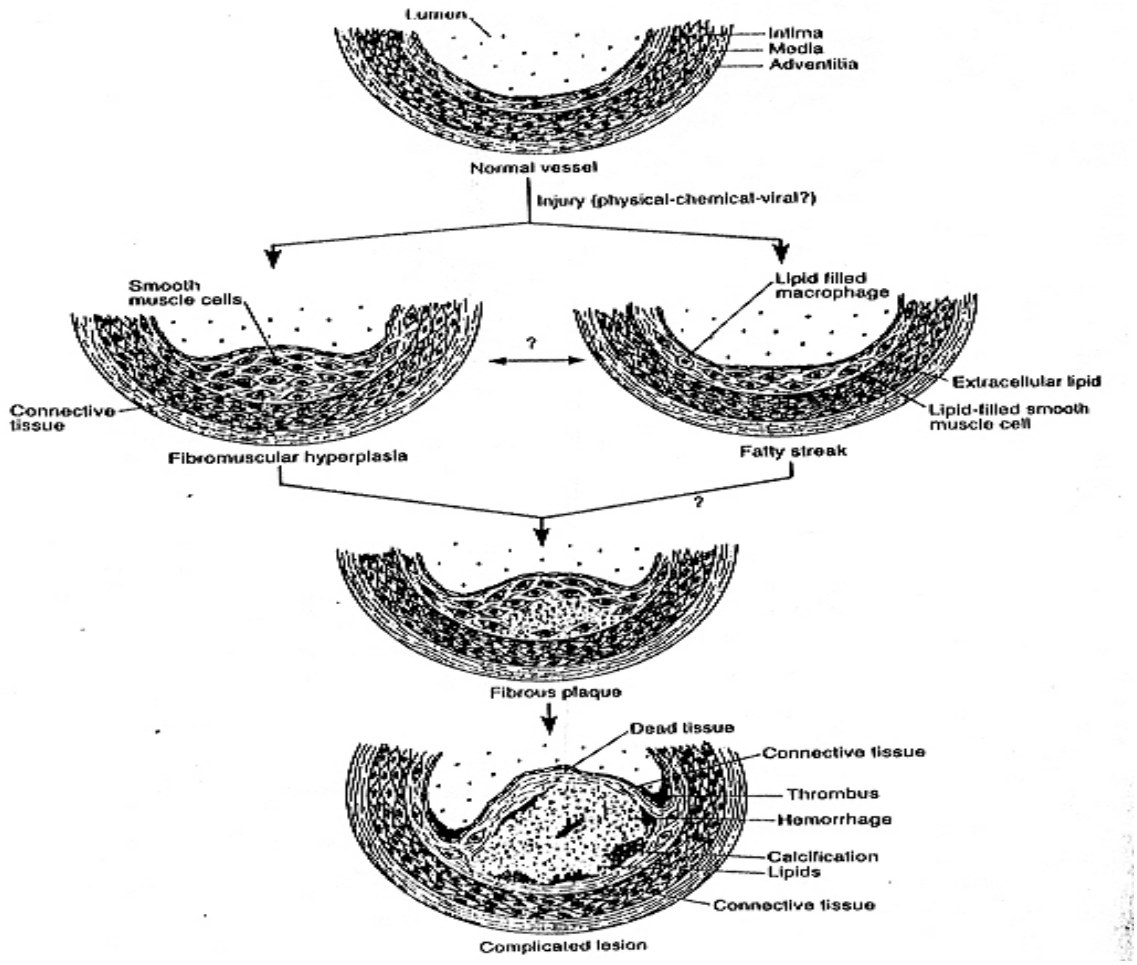


Figure 1- Différents stades de l'évolution de la plaque d'athérosclérose (Ross, 1986).

II. NOUVEAUX CONCEPTS CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DE L'ATHEROSCLEROSE

En 1992 Ross introduit le concept de l'inflammation dans les plaques d'athérosclérose qui devient sur le plan moléculaire, une véritable maladie inflammatoire. Le même auteur, en 1976, proposait l'effraction endothéliale comme « primum movens » de l'athérogenèse, point de départ obligé du processus. Cette théorie a peu à peu évolué vers la notion d'activation endothéliale (Tedgui et Mallat, 2000) en référence à l'activation macrophagique, pour souligner l'importance de la réaction inflammatoire (Libby et Hanson, 1991 ; Van der Wal et al., 1994b ; Holvo et Collen, 1997). En effet, des preuves expérimentales ont montré que le

processus athéroscléreux démarre avec l'activation endothéliale probablement déclenchée par le dépôt de LDL natives et/ou oxydées dans le sous endothélium (Betteridge, 1989 ; Maggi *et al.*, 1994 ; Torzewski *et al.*, 1997). Les cellules endothéliales activées expriment des chimiokines MCP1 et IL8 ainsi que des molécules d'adhérence leucocytaire VCAM1 et ICAM1, à l'origine du recrutement des monocytes circulants (Dejager, 1998 ; Ross, 1999). Ces derniers, après migration, envahissent l'espace sub - endothélial et se transforment en macrophages (Nayler *et al.*, 1994 ; Sanders, 1994 ; Ross, 1995) où les LDL anormalement accumulées s'oxydent et génèrent des cytokines pro-inflammatoires (IL1, IL6, IL12, TNFγ, INFγ) (Napoli *et al.* 1997). Les interactions cellules – différents facteurs modulent donc la formation de la lésion et sa progression (Clarcke *et al.*, 1987 ; Corsini *et al.*, 1995 ; Luscher *et al.*, 1995).

La réaction inflammatoire s'accompagne d'une phase de réparation tissulaire dans laquelle l'activation endothéliale est signalée aux CML médiatiques par l'interaction directe cellules-cellules (Ross, 1986 ; Nayler *et al.*, 1994 ; Tedgui et Mallat, 2000). Dès lors, le changement de l'expression du phénotype des CML de contractile sessile à synthétique prolifératif, mobile et sécrétoire (Campbell et Campbell, 1987 ; Thyberg *et al.*, 1990 ; Desgranges et Larue, 1990) initie plusieurs de leurs activités : la migration de la média vers l'intima, la prolifération (Ross et Glomset, 1973 ; Campbell *et al.*, 1988 ; Ross, 1993 ; Sanders, 1994 ; Corsini *et al.*, 1995) ainsi que la synthèse d'une matrice extracellulaire inappropriée (Clowes et Schwartz, 1985 ; Robert et Labat Robert, 1989 ; Powel *et al.*, 1996).

La migration et la prolifération résultent des interactions plaquettes sanguines- facteurs de croissance - récepteurs des CML qui déclenchent une série d'événements moléculaires intracellulaires dont la restructuration du cytosquelette et l'activation du cycle cellulaire (Sanders, 1994). Ainsi, la modulation des CML, leur migration, l'exagération de leur prolifération, la transformation des monocytes en macrophages et la production de protéines extracellulaires comme les collagènes sont des éléments essentiels qui influent sur le processus athérogène (Kocher *et al.*, 1987 ; Hadjiisky *et al.*, 1991 ; Guyton, 1994 ; Lee, 1996 ; Schneider et Sobel, 1997). « *In situ* », le processus inflammatoire influencé par les cellules endothéliales très activées et les macrophages semble donc moduler la plaque et promeut tant la lyse de certaines macomolécules (élastine) que la synthèse d'autres macromolécules de la MEC en particulier les collagènes (Van der Wal *et al.*,1994b).

Dans cette vision de « l'athéromato-sclérose », l'inflammation lésionnelle est en grande partie dépendante de la constitution biochimique des lipides intralésionnels (Zoch et Katan, 1998) et les dépôts pariétaux de lipides plus ou moins oxydés (athérome) constituent un puissant stimulus inflammatoire susceptible de se compliquer d'ulcération (Van der Wal *et al.*, 1994a ; Moreno *et al.*, 1994) tandis que les phénomènes de fibrose lésionnelle (sclérose) pauvre en cellules inflammatoires et en lipides apparaissent comme des processus stabilisateurs (Newby et Zaltsman, 1999 ; Gutstein et Fusta, 1999).

Les facteurs extrinsèques et intrinsèques impliqués sont respectivement l'action des PDGF produits par les plaquettes, l'augmentation de la vitesse de croissance ainsi que la diminution de l'inhibition de contact en réponse aux facteurs de croissance (Hadrava *et al.*, 1990 ; Fuster *et al.*, 1990 ; 1992).

"*In vitro*" quatre types d'influence sont rapportés par Hadjisky *et al.* (1991), Labat-Robert, (1986).

1 - La stimulation de la prolifération par :

- Les facteurs de compétence : PDGF, EDGF, PDGF like, MDG, IL_1, FGF, SDGF
- Les facteurs de progression : LDL, Ca^{++}, 5HT, IL, IGF, ANG

2- L'inhibition de la prolifération des CML par : EDIF, HS, PGE_2, MG,TNF, INF, Héparine, PGI_2, AMPc

3- La chémotaxie par : PDGF, IL_1

4- L'interaction cellule - matrice par la fibronectine, l'héparine, l'histamine, l'élastase et la libération de peptides par les monocytes / macrophages qui sont des facteurs mitogènes pour les CML et chémotactiques pour les macrophages.

III. LA MATRICE EXTRA-CELLULAIRE (MEC)

La MEC des tissus conjonctifs dont la paroi vasculaire est un composite complexe formé de fibres insolubles, de microfibrilles et de différentes catégories de protéines solubles et de glycoprotéines. Ces macromolécules de la MEC sont schématiquement classées en quatre familles (Robert et Birembaut, 1987) :

- **Les collagènes** : à ce jour, 19 à 20 types sont génétiquement distincts (Tab. I) et présentent différentes organisations (Mayne et Brewton, 1993 ; Robert, 1998). Plusieurs d'entre eux sont représentés dans la paroi vasculaire (I, II, IV, V, VI, VIII, IX, XI) (Burgeson, 1988 ; Rauterburg *et al.*, 1993).
- **L'élastine** : formée à partir d'un monomère : la tropoélastine subit des pontages par action de la lysyl-oxydase et constitue avec les collagènes les protéines fibrillaires de la MEC et les composants majeurs des vaisseaux élastiques comme l'aorte. (Robert et Labat Robert, 1980)
- **Les protéoglycannes** (PG) : macromolécules comportant une chaîne peptidique dite porteuse et une ou plusieures chaînes de glycosaminoglycannes (GAG) à l'exception de l'acide hyaluronique non lié à une protéine. La nouvelle nomenclature basée sur les protéines porteuses a permis la caractérisation de différents types de protéoglycannes : chondroïtine sulfate, dermatane sulfate, kératane sulfate, héparane sulfate. Leur propriété principale est de piéger l'eau et d'assurer la cohésion entre les cellules et la MEC (Wight *et al.*, 1985 ; Robert *et al.*, , 1992).
- **Les glycoprotéines de structure (fibronectine et laminine)** : assurent l'adhésion des cellules à la MEC en interagissant avec des récepteurs membranaires spécifiques : les intégrines (Labat-Robert, 1986).

Utilisant des Anticorps spécifiques, Foidart *et al.*, (1980), Furthmayer *et al.*, (1983) précisent la répartition des principaux composants de la paroi artérielle :

- Le collagène I est présent essentiellement dans la média et l'adventice.
- Le collagène III présente une distribution plus extensive, surtout dans l'intima.
- Les collagènes IV et V sont localisés dans l'endothélium avec un marquage linéaire et autour des CML, au niveau des lames basales.
- Le collagène VI appelé collagène intimal, se trouve également dans la média et autour des CML.
- Les PG ont une distribution analogue à celle du collagène IV.
- La fibronectine est localisée dans l'intima, les lames basales et l'adventice.
- La laminine caractérise exclusivement les lames basales.
- L'élastine est localisée essentiellement au niveau de la média et des limitantes élastiques externes et internes.

Selon Robert et Labat Robert, (1989), le programme de synthèse de la MEC comporte deux étapes importantes :

- Le choix des gènes qui codent pour les macromolécules de la MEC
- La modulation quantitative de l'expression des gènes.

La fonction des CML à l'état mature est d'assurer la composition constante de la MEC (Labat Robert *et al.*, 1990). Cette dernière varie d'une couche à l'autre de la paroi vasculaire. L'adventice, riche en collagène, impose la rigidité et la résistance ; l'intima enrichie en PG et

GAG offre à la paroi sa viscoélasticité et sa compressibilité. La média quant à elle, limitée par les deux lames élastiques est représentée par des couches concentriques de lames élastiques (Wight, 1996). La MEC subit des modifications progressives et importantes au cours du vieillissement (Robert et Labat Robert, 1989), de l'athérosclérose (Robert, 1993) et du diabète (Andresen *et al*, 1996) en interagissant avec les cellules vasculaires pour réguler leur adhésion, leur migration et leur prolifération. Ainsi, les cellules vasculaires sont entourées par une variété de macromolécules formant un ensemble de polymères biochimiquement actifs (Absher et Baldor, 1991 ; Wight, 1996) influençant la viscoélasticité, l'élasticité et la compressibilité de la paroi vasculaire. Par ailleurs, la MEC ne maintient pas seulement l'intégrité structurale de la paroi vasculaire mais intervient également dans la régulation de la physiologie vasculaire par ses liaisons avec les protéines plasmatiques, les facteurs de croissance, les cytokines et divers enzymes. Sa composition étant contrôlée elle aussi par la régulation différentielle de la synthèse et du « turnover » de chacun de ses composants (Wight, 1996 ; Bateman *et al.*,1996 ; Labat Robert, 1998).

A. LES COLLAGENES

Le terme de collagène couvre généralement une famille de protéines qui forment un des composants macromoléculaires essentiels de la MEC (Robert, 1985). Elles partagent un motif structural basal de 3 chaînes polypeptidiques caractérisées par une configuration en triple hélice. Cette dernière a été déduite par diffraction aux rayons X sur le collagène du tendon par Rich et Crick en 1961. Différents travaux ont décrit la structure et la distribution des différents types de collagènes (Weiss et Ayad, 1982 ; Mayne et Burgeson, 1987 ; Van der Rest et Garrone, 1991).

Même si ce n'est pas leur fonction exclusive, les collagènes constituent à la fois des charpentes d'organes, des voies privilégiées de migrations cellulaires ou des feuillets délimitant des compartiments tissulaires. Dans cette catégorie, sont rangés les collagènes fibrillaires de type I et III (Mayne et Brewton, 1993).

Comme l'indiquent les travaux de Schuppan *et al.*, (1998), il est difficile « in vivo » de distinguer ce qui dépend de l'interaction directe avec les collagènes de ce qui résulte d'une rencontre avec l'un des constituants de surface de ces molécules.

Ce sont les études « *in vitro* » qui ont clairement montré l'importance du collagène dans la différenciation cellulaire et donc dans la délivrance d'un message (Trelstad, 1984). De nombreuses données prouvent que les collagènes agissent directement sur les cellules, le plus souvent via des protéines membranaires pouvant être des récepteurs exclusifs ou non (Klein *et al.*, 1997).

Dans les gros troncs artériels, les collagènes de type I et III sont les plus abondamment représentés dans la MEC. En 1984, Chapman et Hulman, visualisent en microscopie électronique à transmission leur architecture fibrillaire. Les autres types de collagènes bien que minoritaires ne seraient pas moins importants et joueraient des rôles précis, notamment le collagène IV qui est essentiellement localisé dans les lames basales, autour des CML (Barnes,1985 ; Katsuda *et al.*, 1992).

1. STRUCTURE MOLECULAIRE

La structure en triple hélice des collagènes fibrillaires présente pour chaque chaîne la forme générale (Gly – Xaa – Yaa)n. Un résidu d'acide aminé sur trois est la glycine qui par ses hydrogènes lie les trois chaînes (Olsen, 1981 ; Uitto, 1989). Les autres résidus Xaa et Yaa représentés fréquemment par la proline et la lysine varient en fonction des types de collagène . La proline souvent située à la suite de la glycine est hydroxylée lorsqu'elle se trouve en position Y. Cette hydroxyproline stabilise la triple hélice (Rousselle et Garrone,

1998). Le facteur n varie en fonction des différents types de collagène. Dans le cas des collagènes fibrillaires, la longueur de l'hélice dépasse 1000 résidus d'aminoacides (Bateman *et al.*, 1996). Biochimiquement, c'est le collagène I qui est le mieux étudié car il représente le principal composant fibrillaire de nombreux tissus (Fig. 2).

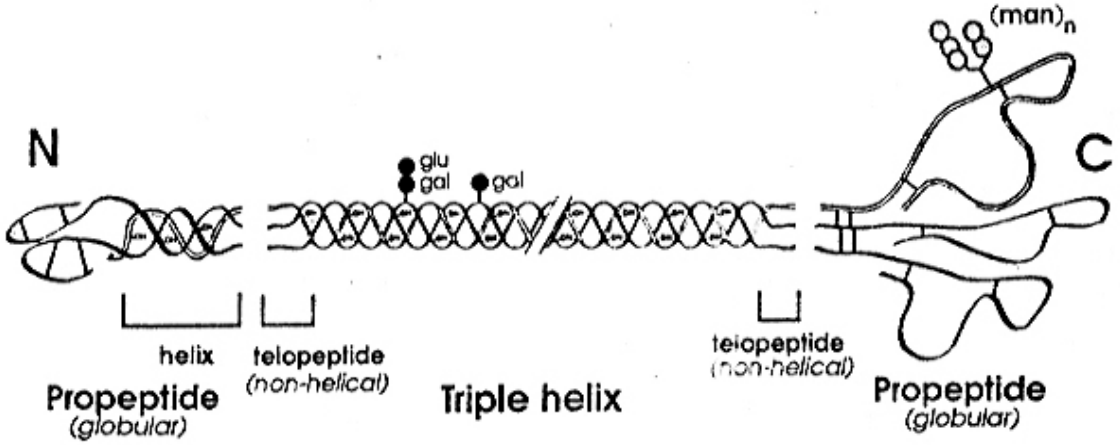


Figure 2 - Structure moléculaire du procollagène I précurseur du tropocollagène (Bateman *et al.*, 1996)

La représentation diagrammétrique du procollagène I montre :

- le domaine de la triple hélice (2 pro α1 (I) + 1 pro α2 (I))
- les propeptides globulaires N et C terminaux (Dion et Myers, 1987)
- la présence de ponts dissulfures intra-chaînes dans les propeptides N et C. Les ponts disulfures inter-chaînes caractérisent seulement les propeptides C
- la fixation de molécules de mannose à chaque propeptide C
- une homogénéité de structure dans les domaines globulaires C de tous les procollagènes fibrillaires. Cette conservation de structure reflète probablement leur rôle essentiel dans les fonctions de reconnaissance, d'assemblage initial des molécules et la formation de la triple hélice (Takahara *et al.*, 1991 ; Prockop *et al.*, 1979)
- une diversité structurale du domaine globulaire N du procollagène. Les propeptides N des chaînes α1 (I) et α1 (III) sont similaires ; ils comprennent un domaine globulaire riche en cystéine (Ryan et Sandal, 1990), un court domaine en triple hélice ainsi qu'une petite région globulaire qui contient le site de clivage de la protéinase (Ramirez, 1989). Le propeptide N de la chaîne α2 (I) ne contient pas de domaine riche en cystéine (de Wet *et al.*, 1987).
- les télopeptides courts N et C terminaux, non hélicoïdaux qui restent aux extrémités de la molécule après le clivage protéolytique des propeptides (Ramirez, 1989 ; Bateman *et al.*, 1996).
- Les résidus Lys des télopeptides C et N sont des sites de liaison importants dans les collagènes I, II et III suggérant que la principale fonction des télopeptides est de stabiliser les fibrilles des collagènes extracellulaires (Eyre et Güllop, 1984).

2. ETAPES DE LA BIOSYNTHESE DES COLLAGENES

٢,١ *Organisation des gènes des collagènes*

Les chaînes de collagènes fibrillaires sont codées par des gènes comprenant 52 à 53 exons (Chu et Prockop, 1993) lesquels sont répartis en 3 domaines qui codent pour l'hélice de collagène, la région du propeptide C et celle du propeptide N.

Le domaine de la triple hélice est codé par 44 exons (Ramirez, 1989). Les exons de la triple hélice de tous les collagènes fibrillaires débutent par un codon pour la glycine à l'extrémité 5' et se terminent par un codon Y à l'extrémité 3' spécifique à chaque type de collagène.

Les exons codant pour le propeptide C sont plus larges que ceux codant pour l'hélice principale et sont hautement conservés ; ce qui explique l'importance de ce domaine dans la sélection de la chaîne et l'assemblage en trimères. Le domaine globulaire riche en cystéine est codé par l'exon 2 dans les chaînes α1 (I + III) (Bateman *et al.*, 1996).

Les exons codant pour le propeptide N sont plus variables en nombre et en taille. L'exon 2 n'existe pas dans les chaînes α2 (I) (Ryan et Sandell, 1990).

Chez l'homme, les gènes des chaînes α1 (I), α2 (I), et α1 (III) sont respectivement localisés sur les chromosomes 17, 7 et 2 (Myers et Emmanuel, 1987 ; Nimmi, 1991).

٢,٢ *Transcription*

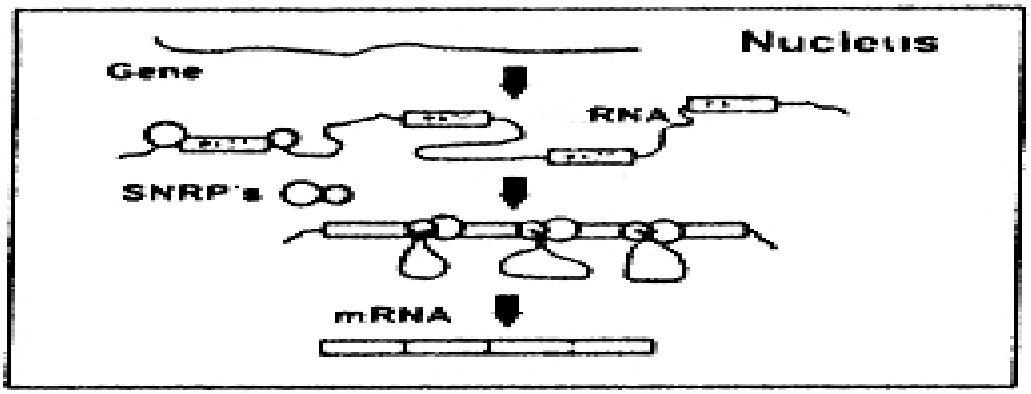


Figure 3 - Transcription et maturation du préRNA en mRNA après épissage des introns (Laurent, 1987).

Le gène de collagène entier incluant les séquences non codantes est transcrit en pré-RNA par l'ARN polymérase II (Fig. 3).

Trois traitements majeurs du pré-RNA nucléaire ont été identifiés et sont communs à la majorité des molécules de RNA transcrites des gènes eucaryotes :

- La modification de l'extrémité 5' du RNA par addition d'une guanine (G terminal) et sa méthylation, indispensable à l'exportation du RNA mature au travers des pores
- La polyadénylation de l'extrémité 3' par addition du signal poly (A)
- L'épissage des introns non codants fait intervenir le « spliceosome » : complexe de ribonucléoprotéines nucléaires de petite taille ou Small Nuclear RNP (SNuRP's). La maturation du RNA dépend d'un épissage réalisé correctement (Hames et Glover, 1988 ; Lamond, 1993).

Le RNA mature comporte donc trois régions différentes :

- le segment 5' non codant terminé par la coiffe
- la région codante de longueur variable
- le segment 3' non codant se terminant par la queue poly-A

2.3 Traduction

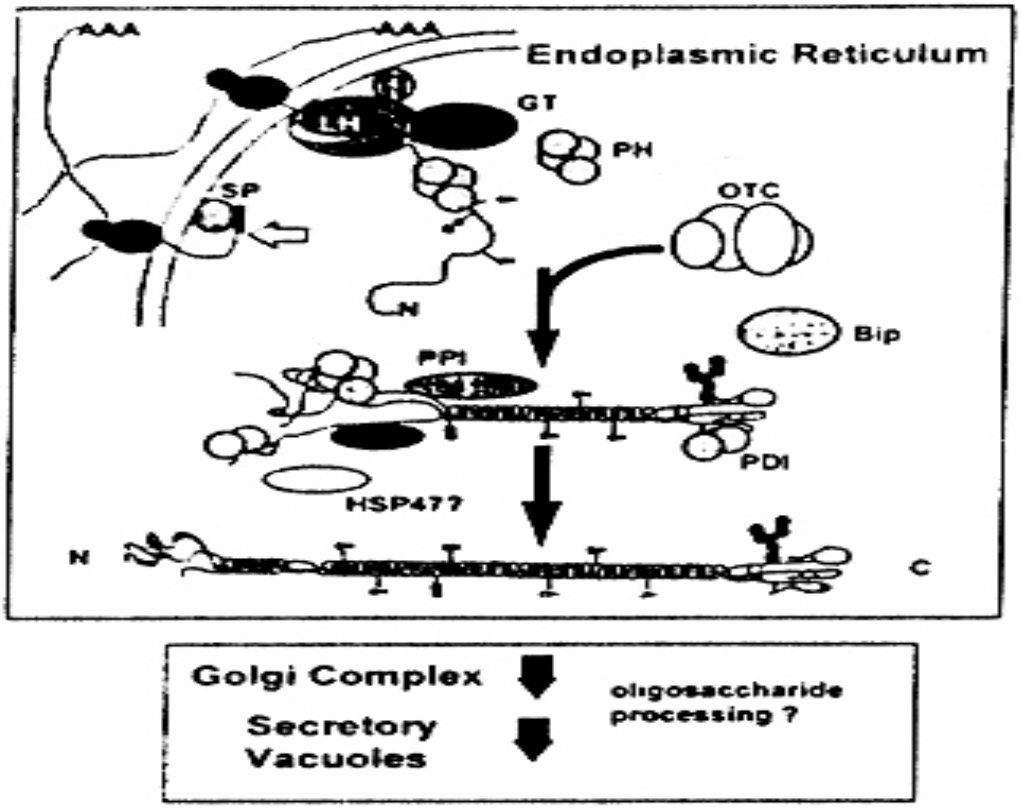


Figure 4 - Traduction, hydroxylation et glycosylation du collagène. (Bateman et al., 1996)
SP : signal peptide ; LH : Lysyl hydroxylase ; PH : prolyl 4-hydroxylase ; GT : hydroxyl galactosyltransférase et galactosylhydroxylysyl glucosyltransférase ; OTC : oligosaccharyltransférase complex ; PDI : protein disulphide isomérase ; PPI : peptidyl-propyl cis-trans isomérase ; BiP et HSP47 : polypeptid chain binding protein

Comme toutes les autres protéines sécrétées, le produit de traduction du collagène I est adressé initialement au REG et dès le début de la biosynthèse de la molécule de collagène, des interactions avec d'autres protéines s'avèrent essentielles (Fig. 4) (Rousselle et Garonne, 1998). Ainsi, le peptide signal N terminal, en cours de traduction, se lie à la particule de reconnaissance signal ou SRP (signal recognition particle) (Bernstein *et al.*, 1989) laquelle se fixe à son récepteur intégré à la membrane du REG (docking protein). En même temps que se continue la traduction (Rothman, 1988a), la translocation s'effectuerait à travers la membrane du REG par un complexe de 5 protéines (Sanders et Schekman, 1992). Le signal du préprocollagène est clivé du polypeptide à son arrivée dans la lumière du réticulum par une protéine membranaire intégrée luminale : la signal peptidase (Evans *et al.*, 1986).

Les interactions avec d'autres protéines s'avérent donc essentielles ; il convient de signaler au sein même du réticulum endoplasmique l'association des chaînes α des procollagènes notamment de type I avec des protéines chaperonnes dont la mieux caractérisée est la hsp47 (Shroff *et al.*, 1993). Selon Nagata (1996), cette association est destinée à éviter une agrégation précoce, à faciliter l'obtention d'une conformation correcte et à éliminer les chaînes incorrectement formées.

2.4. Modifications post - traductionnelles

2.4.1. L'Hydroxylation

C'est une étape importante de la biosynthèse des collagènes (Fig. 4) ; elle permet la formation d'un certain nombre de résidus hydroxy-proline et hydroxy-lysine grâce à l'action d'enzymes spécifiques du reticulum endoplasmique granuleux (Peterkofsky et Assad, 1979, Robert et Birembaut, 1987) : les hydroxylases. Ces dernières, bien que catalytiquement similaires ne présentent pas d'analogies significatives (Myllyla *et al.*, 1991).

Kiviriko et Myllyla (1982) identifient la propyl 4-hydroxylase, la propyl 3-hydroxylase et la lysyl hydroxylase qui nécessitent la présence de certains cofacteurs comme l'ion Fe^{2+}, O_2 et l'acide ascorbique. La présence de la propyl 4-hydroxylase est essentielle pour la stabilité de la triple hélice de collagène et hydroxyle la proline en position Y. La lysyl hydroxylase permet la formation de certains résidus hydroxy lysine formés qui sont essentiels pour la stabilité des liens intermoléculaires de collagène (Kiviriko et Myllyla, 1979).

"*In vitro*", les CML gardent leur capacité de synthétiser les protéines fibreuses. En effet, elles synthétisent le précurseur (procollagène) et les collagènes majeurs I et III (Burke *et al*, 1977, Layman *et al*, 1977, Sage *et al*, 1979). Par ailleurs, il a été montré que l'addition d'ascorbate dans le milieu de culture stimule la synthèse des collagènes grâce à l'action des enzymes spécifiques du réticulum endoplasmique granulaire (Peterkofsky et Assad, 1979), en augmentant la transcription des gènes de collagène marqué par une élévation des taux de RNA messager codant pour les collagènes I et III (Peterkofsky, 1991). L'hydroxylation de la proline précède celle de la lysine.

2.4.2. La glycosylation

Cette étape permet la fixation du galactose et du glucose sur certains résidus hydroxy-lysine (HO-Lys) (Schwartz *et al.*,1982 ; Barone *et al.*,1985 ; Robert et Birembaut, 1987) (Fig. 4).

Deux enzymes spécifiques catalysent la glycosylation de l'HO-Lys sur la chaîne du collagène : l'hydroxylysyl galactosyltransférase et la galactosylhydroxylysyl glucosyltransférase (Kivirikko et Myllyla, 1979). La première catalyse l'addition du galactose sur le résidu HO-Lys et la deuxième permet l'addition du glucose sur certains résidus galactosylhydroxylysine. Les groupements glucidiques se présentent donc sous forme de monosaccharides : le galactose et de disaccharides : le glucosylgalactose (Bateman *et al.*, 1996). A ce jour, la fonction précise de la glycosylation du résidu HO-Lys par les carbohydrates reste peu claire. Toutefois, ces derniers peuvent influencer les propriétés biologiques du collagène ; il semblerait, selon Frey et Raby, (1991) que la glycosylation aurait deux rôles : l'orientation des molécules lors de leur assemblage et la régulation des liaisons intermoléculaires.

2.5. Formation de la triple hélice et sécrétion du procollagène

La synthèse simultanée de plusieurs types de fibrilles de collagène par la même cellule implique un processus d'assemblage, une reconnaissance des chaînes et une sélection appropriée ; ce qui suggère que la chaîne de sélection intervient très tôt dans la transcription du mRNA.

Selon Doege et Fessler (1986), Bateman *et al.*, (1996), les interactions initiales menant à la formation de la triple hélice via le propeptide C suivie par l'association, l'alignement et la formation des ponts dissulfures inter-chaînes stabilisent la molécule. Il est établi que le processus n'est pas spontané ; il fait intervenir enzymes, chaînes

polypeptidiques et molécules chaperonnes qui lient progressivement les noyaux polypeptidiques (Hendrick et Hartl, 1993).
« *In vivo* », la formation des ponts dissulfures est catalysée par les PDI (protein disulphide isomérase) et la subunité β de la propyl-4-hydroxylase (Noiva et Lennarz, 1992). Les travaux de Bassuk et Berg, (1989) ont suggéré que l'interaction stable du complexe propyl-4-hydroxylase – substrat peut être un important mécanisme de contrôle de qualité qui prévient la sécrétion de molécules incorrectes ou incorrectement enroulées.

La voie de sécrétion de la triple hélice est similaire aux autres protéines extracellulaires via le complexe de Golgi et les vésicules de sécrétion. Selon Hulmes *et al.*, (1983) le procollagène est sécrété sous forme d'agrégats.

2.6. Traitement extracellulaire

La conversion du procollagène en tropocollagène a lieu dans le milieu extracellulaire par clivage des propeptides C et N terminaux sous l'action d'endopeptidases spécifiques, une procollagène N-protéinase (NP) et une procollagène C-protéinase (CP).

- la procollagène I ou III N protéinase Ca^{++} dépendante qui clive les N propeptides des collagène I (Hojima *et al.*, 1989) et collagène III (Halila et Petonen, 1984).
- La procollagène C protéinase qui clive les propeptides C des collagènes I et III (Hojima *et al.*, 1989) ; son activité est régulée par une glycoprotéine : la C-protéinase enhancer ou EN (Kessler *et al.*, 1990).

Le processus de l'assemblage des molécules de tropocollagène en fibrilles est stabilisé par la lysyl oxydase (LO).

Ce clivage ne s'effectue pas de la même manière pour tous les types de collagène, ce qui conditionne l'arrangement des molécules de tropocollagène (Burgeson , 1988), néanmoins, le clivage du propeptide C est un prérequis à la formation de la fibrille et celui du propeptide N est essentiel à l'organisation régulière de la fibrille (Kadler *et al.*, 1987 ; Kessler *et al.*, 1990).

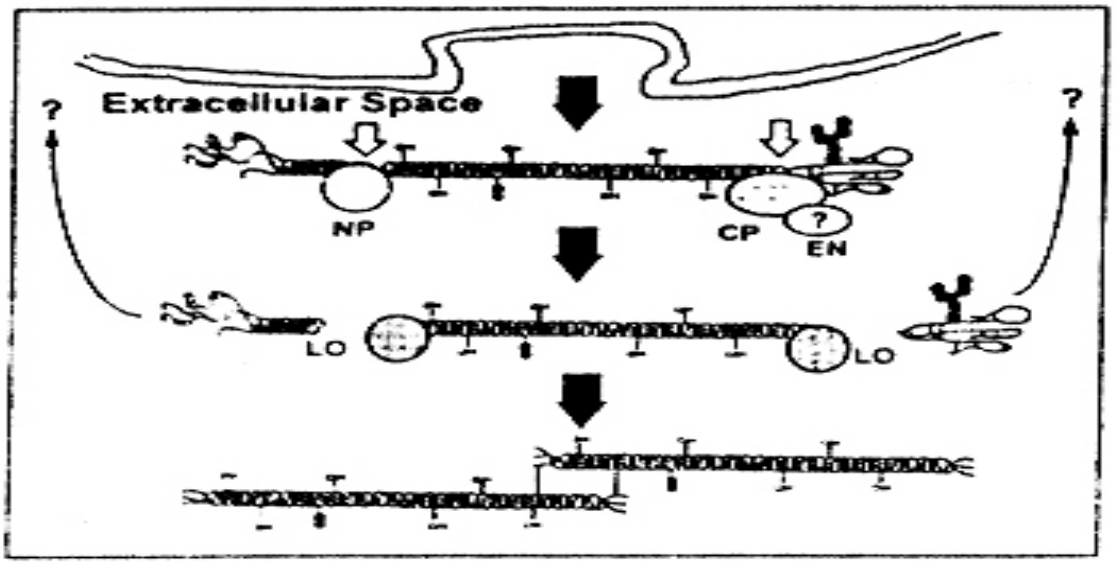


Figure 5 - Conversion du procollagène en tropocollagène par clivage des extrémités N et C terminales. (Kessler et al., 1990)
NP : procollagen N-proteinase ; CP : procollagen C-proteinase ; EN : C- proteinase enhancer ; LO : lysyl oxydase

2.7. Fibrillogenèse

Selon plusieurs auteurs, les mécanismes biochimiques précis de la fibrillogenèse sont moins bien définis que la voie des biosynthèses et se basent essentiellement sur l'expérimentation "*in vitro*". Cette dernière a montré que les collagènes I et III ont tendance à s'agréger en assemblages filamenteux, ordonnés, (Fig. 6) mis en évidence par diffraction aux rayons X (Brodsky et Ramshaw, 1982) et microscopie électronique à transmission (Chapman et Hulmes, 1984).

Les séquences des télopeptides extra-hélicoïdaux paraissent jouer un rôle clef dans la régulation de la fibrillogenèse du collagène I (Veis et Payne, 1988). Les travaux de Kadler *et al.*, (1987) ont montré que le clivage du propeptide C est indispensable pour la formation de la fibrille de collagène I ; le clivage du propeptide N est essentiel pour la morphologie régulière de la fibrille (Romanic *et al.*, 1992). D'autres molécules de la matrice extracellulaire interagissent avec le collagène et interviennent en régulant les différentes liaisons ; le domaine catalytique étant localisé dans la partie C terminale de la molécule (Mariani *et al.*, 1992).

Dans le milieu extracellulaire, les structures fibrillaires unitaires s'assemblent spontanément en protofibrilles, fibrilles, fibres et faisceaux. Ils acquièrent alors une grande solidité ; ce qui confère à la paroi vasculaire «une résistance mécanique» (Robert et Birembaut, 1987 ; Robert, 1993).

Les collagènes fibrillaires sont donc tous construits sur le même schéma avec un N-propeptide et un C-propeptide de part et d'autre de la triple hélice qui sont clivés après sécrétion du trimère (Prockop *et al.*, 1979 ; Kielty *et al.*, 1993) (Fig.6).

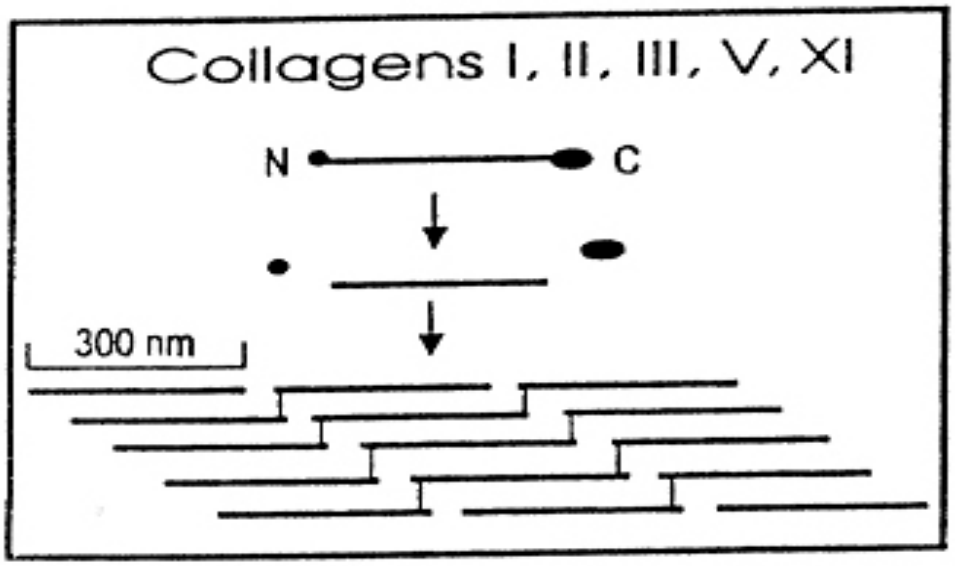


Figure 6 - Assemblage filamenteux des tropocollagènes. (Prockop *et al.*, 1979).
Après le clivage des propeptides N et C terminaux, les molécules de tropocollagène s'organisent pour former la protofibrille de collagène puis la fibrille (5 à 6 protofibrilles).

B. LA GLYCATION

Parmi les modifications les plus observées au cours de l'athérogenèse (Lyons, 1993), de l'angiopathie diabétique (Oimomi al., 1987 ; Muh et Legrand, 1987 ; Ahmed, 1991) et du vieillissement (Reiser, 1991) il faut mentionner la glycosylation non enzymatique ou glycation (Holmquist et Schroder, 1966) des protéines (Robins et Bailey, 1972 ; Means et Chang, 1982). Elle correspond à une modification post transcriptionnelle par fixation non

enzymatique du glucose aux protéines (Allen *et al.*, 1958) (Fig. 7). Rahbar *et al.* (1986) ; Ahmed et Furth, (1990) démontrent que l'importance de la glycation des protéines comme l'hémoglobine glycosylée A1C est proportionnelle à la glycémie.

Le mécanisme réactionnel consiste en la fixation de glucose sur certaines fonctions aminées. En effet, la molécule de glucose se condense initialement grâce à sa fonction semi-aldehyde avec la fonction α-aminée de l'acide aminé terminal ou avec « les groupes aminés » des lysines et hydroxylysines des chaînes peptidiques. Cette réaction dite réaction de Maillard (Mossaz et Assal, 1987 ; Igaki *et al.*, 1990 ; Monnier, 1990) permet la formation d'une base de Schiff réversible et instable (Fig. 8) (Higgins et Bunn, 1981). Celle-ci se transforme rapidement en une cétoamine ou produit d'Amadori plus stable mais encore réversible et proportionnel au taux de la glycémie (Fu *et al.*, 1992). Après plusieurs réactions comme la déshydratation lente, les produits d'Amadori deviennent des produits finaux de glycosylation (AGES : advanced glycosylation end products) irréversibles, cycliques et prêts à piéger les fonctions amines libres des protéines voisines (Monnier et Cérami, 1981 ; Cérami *et al.*, 1987 ; Ruderman *et al.*, 1992). Les AGEs peuvent être détectés "*in vivo*" par des procédés immunochimiques (Myakita *et al.*, 1992)

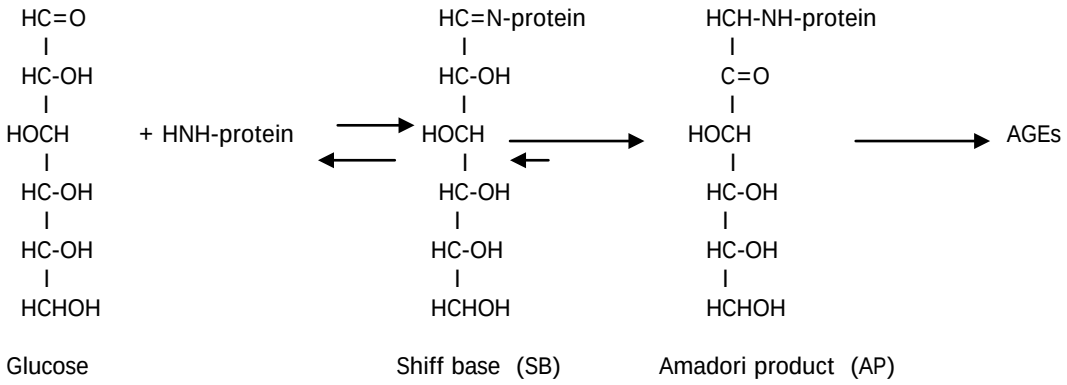


Figure 7 - Réactions chimiques conduisant à la glycation d'une protéine (Ahmed, 1991)

La formation d'AGEs affecte la conformation des protéines, altère leurs fonctions biologiques avec la formation des ponts intra et inter moléculaires et conduit à l'augmentation du poids moléculaire, à la modification de l'activité enzymatique et celle de la demi-vie des protéines (Robert et Penaranda, (1953) ; Ahmed, 1991). De plus, les protéines glycatées peuvent réagir avec l'oxygène et former des radicaux libres oxygénés par l'intermédiaire des produits d'Amadori lesquels présentent un groupe cétol qui a la propriété de transmettre des électrons à l'oxygène moléculaire formant ainsi des radicaux superoxydes. Ces composés initient la dégradation des protéines et conduisent à des altérations fonctionnelles (Robert, 1993) (Fig. 7).

Les collagènes I et III sont des protéines favorables à la glycation (Robert *et al*, 1985) notamment le collagène III car plus riche en lysine et hydroxylysine (Kivirikko, 1973). En outre, leur localisation extracellulaire les expose directement aux variations de la glycémie qui influe sur le phénomène (Muh et Legrand, 1987). Ces réactions conduisent à une rigidification progressive de la molécule et à une résistance aux actions enzymatiques telles la collagénase ; ce qui induit l'arrêt de tout renouvellement et la rigidification de la paroi vasculaire (Robert, 1993) par pontage des fibres (Brownlee *et al.*, 1988).

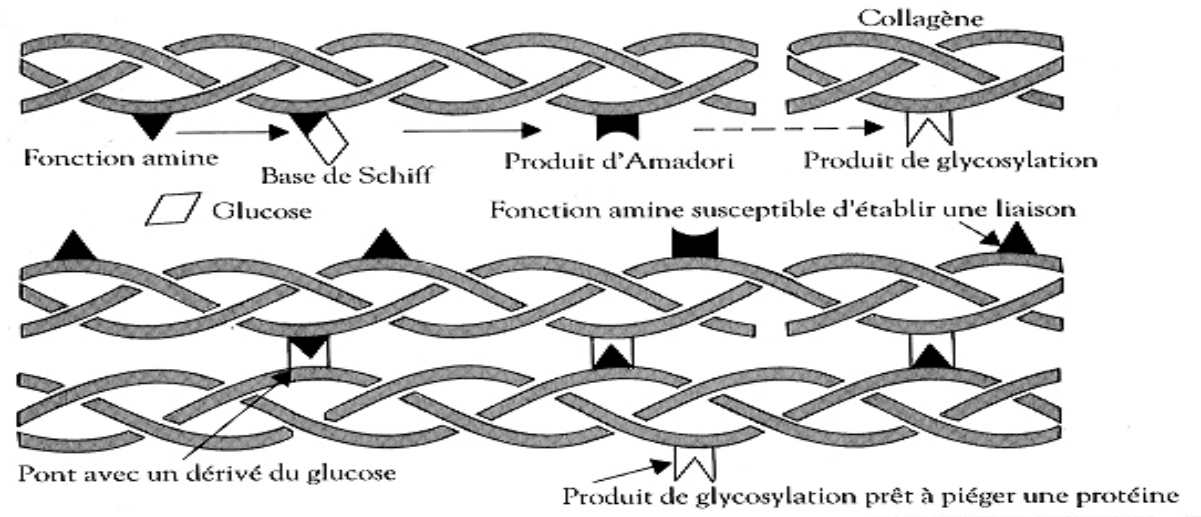


Figure 8 - Schéma reproduisant la glycosylation non enzymatique des chaînes α des collagènes. (Cérami *et al.*, 1987). Elle conduit à la formation d'AGES ou produits de glycosylation qui facilitent le pontage avec les fibres voisines.

Outre les protéines du tissu conjonctif comme les collagènes et la fibronectine, de nombreux travaux ont montré que la glycation affecte au cours du diabète un grand nombre de protéines telles :

- les protéines cellulaires : l'hémoglobine glycosylée A1C (Bailey, 1980 ; Little *et al.*, 1988), la fibronectine (Tarsio *et al.*, 1987).
- Les protéines circulantes : l'albumine (Vaughan *et al.*, 1984 ; Shaklaï *et al.*, 1984), l'insuline (Dolfer et Wieland, 1979), les LDL (Schleicher et Wieland, 1981 ; Nakaï *et al.*, 1991), les HDL (Witzium *et al.*, 1982).

C. RELATIONS CELLULE - MATRICE

Les interactions cellules - matrice extracellulaire contrôlent de nombreuses réactions telles la motilité cellulaire, l'adhésion, l'agrégation et l'étalement. Ces réactions jouent un rôle prépondérant dans plusieurs phénomènes biologiques comme la différenciation cellulaire, la prolifération.... et nombre de ces interactions sont médiées par des récepteurs cellulaires transmembranaires de la famille des intégrines (Hynes, 1987 ; Faury, 1998) qui participent à l'adhésion des cellules aux protéines de la MEC (Labat Robert, 1986 ; Hynes, 1987). Ce sont des molécules de reconnaissance cellulaire doublées d'activité dans le transfert bidirectionnel de l'information. Au cours de certaines maladies comme l'athérosclérose et le diabète l'on assiste à des modifications qualitatives et quantitatives des intégrines (Labat-Robert, 1998).

La famille des intégrines comporte un nombre de récepteurs transmembranaires relativement important. Ce sont des hétérodimères comportant le plus souvent deux sous unités α et β (Labat-Robert, 1992 ; 1998). La boucle formée par les parties extracellulaires interagit avec les composants de la MEC. Chacune des sous-unités contient un domaine extracellulaire hydrophobe et un domaine plus court cytoplasmique qui interagit avec le cytosquelette notamment l'actine via diverses molécules dont la taline, la vinculine et l'α actinine. (Otey, 1990 ; Labat-Robert, 1992) (Fig. 9, 10). Cette interaction joue un rôle important dans l'adhésion et la motilité. Les récepteurs de la MEC qui reconnaissent les CML aortiques sont les intégrines β1. (Clyman *et al.*, 1990a, 1990b). Selon les mêmes auteurs, chacun des récepteurs est un hétérodimère dans lequel plusieurs sous unités α partagent en commun la sous unité β1. Les CML font intervenir trois sous unités α ; α1 β1 étant le récepteur majeur exprimé sur les CML après un accident vasculaire (Gotwals *et al.*, 1996).

Selon Clyman *et al.* (1990a,b), les récepteurs de la MEC sur les CML aident celles-ci durant la contraction et au cours de leur migration vers l'intima lors d'une lésion endothéliale.

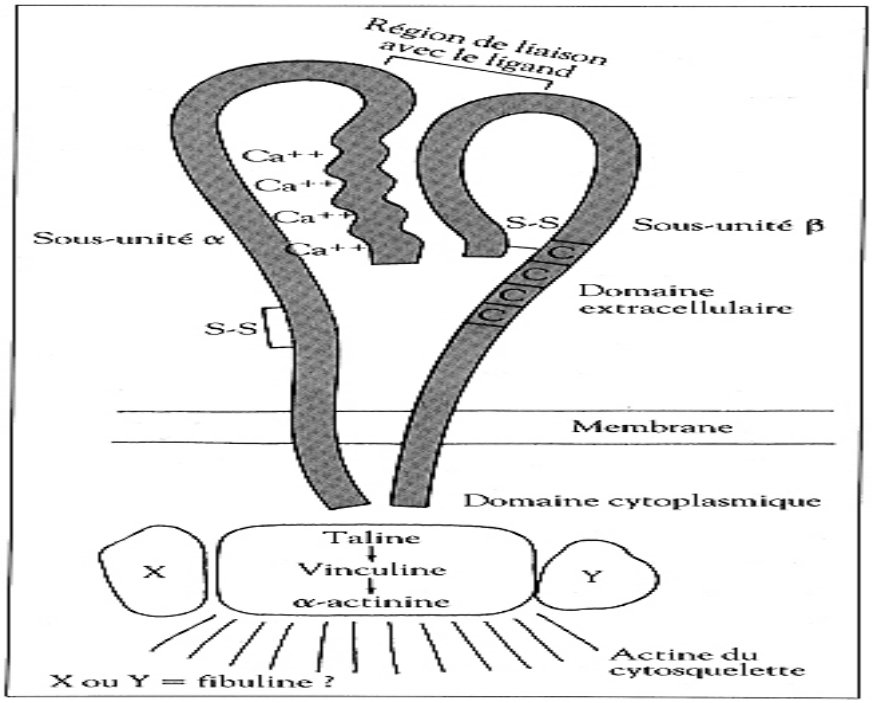


Figure 9 - représentation schématique d'une intégrine (Labat-Robert, 1992)

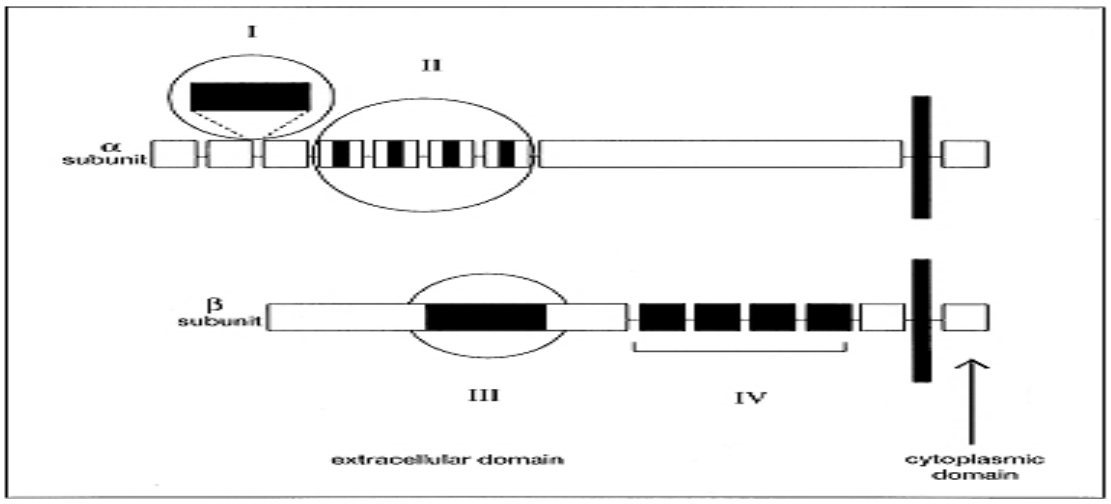


Figure 10 - Représentation des différents domaines (I, II, III, IV) des sous unités α et β d'une intégrine. (Labat Robert, 1998)

Les intégrines ne sont plus considérées comme des ancres transmembranaires statiques, permettant seulement la connexion entre MEC et cellules. A travers ces molécules, la MEC peut influencer le milieu intracellulaire et modifier le comportement de la cellule (Labat Robert, 1986 ; Robert et Labat Robert, 1989) ; elle peut même modifier l'expression des gènes de la cellule (Labat-Robert, 1998). Par conséquent,

l'interaction cellule – matrice peut être représentée comme un feed back informationnel en boucle (Fig. 11). Il débute avec la cellule qui synthétise sa matrice spécifique, laquelle interagira en retour avec la cellule via les intégrines (Hynes, 1987 ; Robert et Labat Robert, 1989). Le comportement cellulaire devient donc dépendant des modifications de la MEC et la dérégulation de l'expression de macromolécules induit des modifications du tissu conjonctif au cours de certaines pathologies comme le vieillissement (Robert, 1986 ; Robert et Peterszgi, 1998), l'athérosclérose (Robert, 1985 ; Robert *et al.*, 1992) et le diabète (Kern *et al.*, 1979 ; Monnier *et al.* 1984 ; Brownlee, 1992).

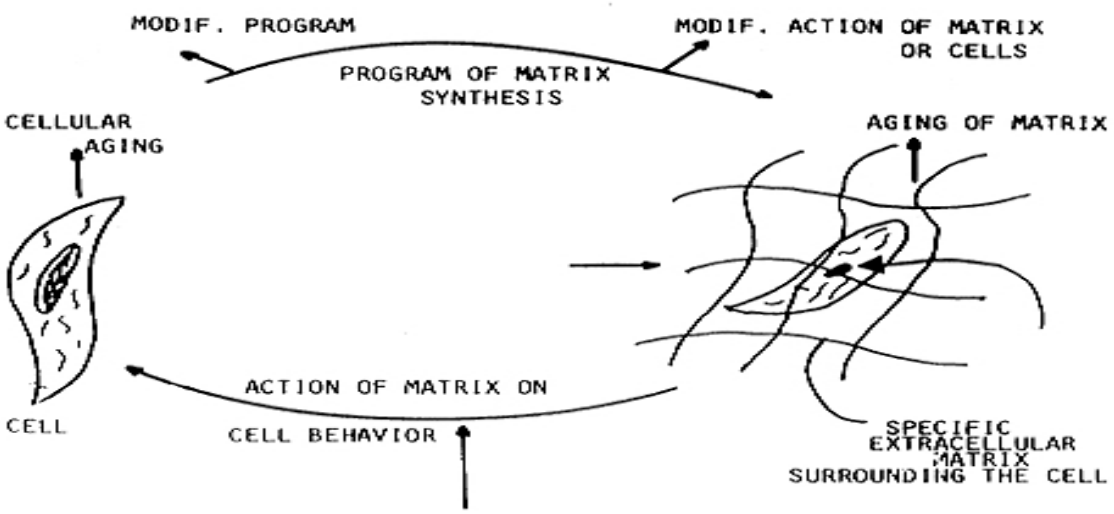


Figure 11 - Interaction cellule - matrice dans le programme de synthèse de la MEC. (Robert et Labat Robert, 1989).

IV. LE CHOLESTEROL INTRACELLULAIRE

A. LES MARQUEURS DE L'ATHEROGENICITE

De Marchand (1904) qui introduisit le terme d'athérosclérose après identification de dépôts lipidiques observés dans la sous - intima aortique à Anitschkow (1913) qui a induit des lésions athéroscléreuses chez le lapin, à Page et Bernhard (1935), Siperstein *et al.* (1951) qui ont observé une augmentation de cholestérol sérique après administration de cholestérol, à ce jour, la thèse lipidique est devenue progressivement dominante (Frederickson *et al.*, 1967 ; Frederickson et Levry, 1972). De nombreuses enquêtes épidémiologiques et rétrospectives, effectuées pendant les trois dernières décennies ont confirmé la réalité et l'importance de l'association entre la concentration plasmatique en cholestérol et l'incidence des cardiopathies ischémiques (Richard *et al.*, 1977 ; Turpin, 1989, 1997).

Le cholestérol est un constituant tétracyclique, alycyclique comportant une fonction alcool secondaire en C_3. Une de ses destinées est structurale car il entre dans la composition de toutes les membranes cellulaires (Oram *et al*, 1987b). De plus, Il circule dans le plasma sous deux formes : une forme libre qui représente 1/3 du cholestérol total et une forme estérifiée par un acide gras insaturé (l'acide linoléïque essentiellement, plus accessoirement l'acide oléïque) ou saturé (l'acide palmitique) qui représente 2/3 du cholestérol total (Goldstein et Brown, 1983).

Dans l'organisme, le cholestérol provient soit de l'alimentation (voie exogène) (Fig. 12), soit du foie où il est synthétisé à partir de l'acétyl CoA (voie endogène) (Fig. 12). Dans le flux sanguin, il circule associé à d'autres lipides et protéines spécifiques : les apoprotéines ; l'ensemble constituant les lipoprotéines. En 1967, Frederickson *et al.*, puis Alaupovic en 1982 définissent le concept de la lipoparticule qui s'appuie sur le fait que la partie intelligente de la lipoprotéine correspond à l'apoprotéine qu'elle contient (Fig. 12, 13). Ils définissent ainsi les lipoprotéines simples qui contiennent une seule apoprotéine (Lp B, Lp AI...) et les lipoprotéines complexes qui contiennent plusieurs apoprotéines (Lp B:E, Lp AI:AII...). Cette nomenclature a permis de définir une classification fonctionnelle des lipoprotéines. Les lipoprotéines à apo B sont chargées de délivrer les lipides, dont le cholestérol, aux tissus périphériques (VLDL, IDL, LDL) et celles à apo AI sont responsables du retour du cholestérol des tissus périphériques vers le foie (HDL) (Gordon *et al.*, 1977b ; Fruchart, 1992 ; Duriez et Fruchart, 1997). En résumé, selon la composition de la lipoprotéine qui le transporte, le cholestérol n'a pas le même effet physiologique (Brown et Goldstein, 1984 ; Turpin, 1989 ; Lutton, 1990).

De nombreux arguments expérimentaux et épidémiologiques permettent d'affirmer que les LDL (low density lipoprotein), aux caractères physico-chimiques parfaitement connus, se situant au bout des chaînes cataboliques des lipoprotéines de très basse densité (les VLDL ou very low density lipoprotein) et transportant le cholestérol estérifié du foie aux cellules (Brown et Goldstein, 1975 ; Brown *et al.*, 1987), sont hautement athérogènes (Belian, 1996 ; Turpin, 1997). Les lipoprotéines de haute densité ou HDL ont quant à elles un rôle cardioprotecteur (Gordon *et al.*, 1977a ; Prockok *et al.*, 1986 ; Moulin *et al.*, 1987) car elles permettent une épuration ou un transport inverse du cholestérol des cellules périphériques vers le foie, principal site d'épuration de catabolisme des HDL (Miller et Miller, 1975 ; Procock *et al.*, 1986 ; Oram *et al.*, 1987a ; Duriez et Fruchart, 1997 ; Combettes-Souverain *et al.*, 1999).

Les LDL/VLDL sont porteuses d'apoprotéines B/E alors que les HDL sont caractérisées par les apoprotéines AI et AII (Turpin, 1989 ; Fruchart, 1992). Un changement de la quantité ou de la composition des apoprotéines affecte les concentrations des lipides plasmatiques (Fronlich *et al.*, 1989).

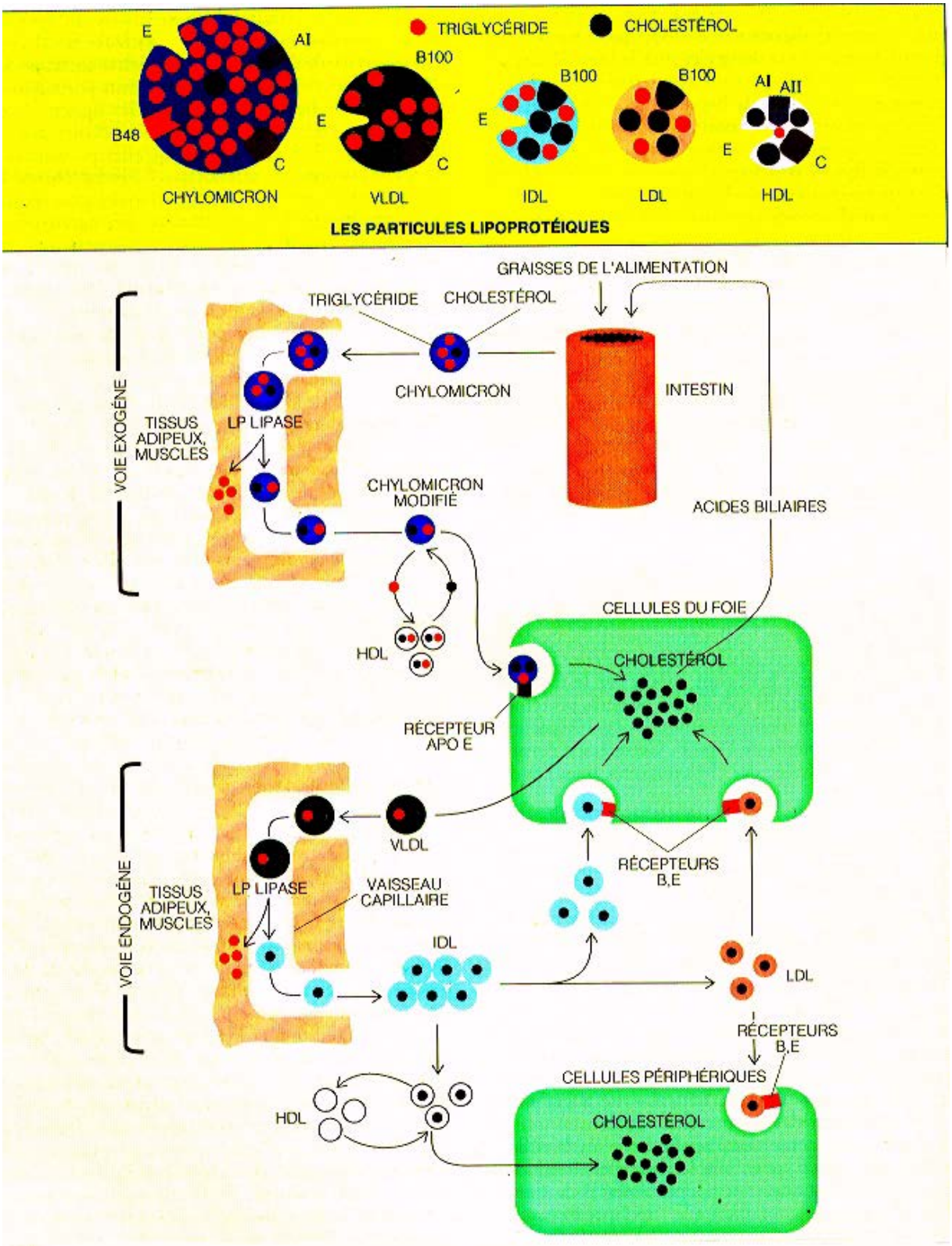


Figure 12 - Représentation des différentes particules lipoprotéiques et leurs sites récepteurs spécifiques.
Voies exogène et endogène du cholestérol montrant l'intervention des différentes particules lipoprotéiques (Fruchart, 1993).

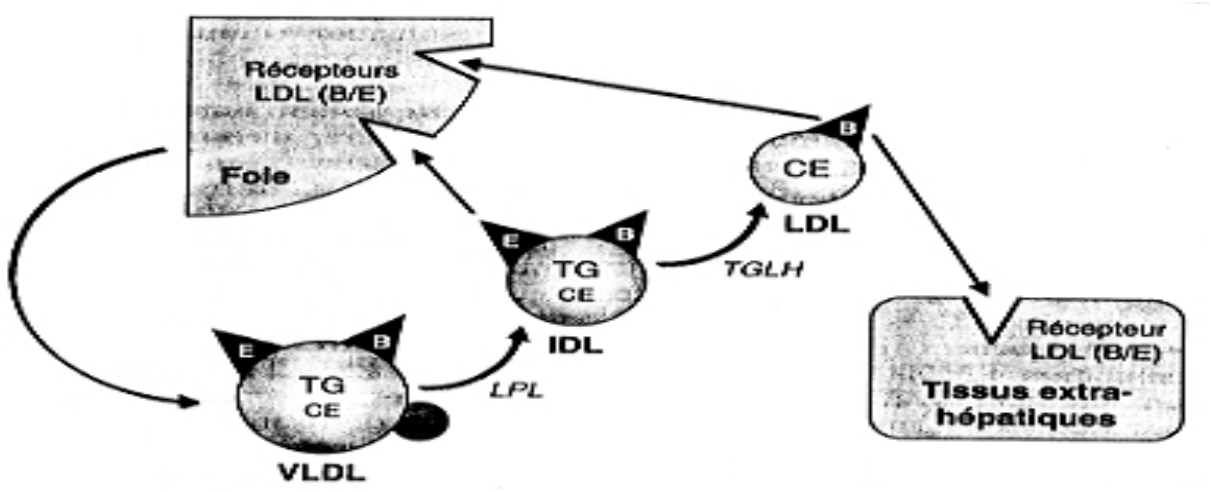


Figure 13 - Métabolisme des particules LDL. (Rabès *et al.*, 1997). LPL : lipoprotéine lipase ; TGLH : triglycéride lipase hépatique ; B, E, C II : apolipoprotéines B-100, E, C II ; TG : tiglycérides ; CE : cholestérol estérifié.

1. LIPOPROTEINES CONTENANT L'APO I ET L'APO II (HDL)

Les HDL natives proviennent du foie, de l'intestin et de la lypolyse intravasculaire des lipoprotéines riches en TG . Leur maturation en HDL3 puis HDL2 se fait par acquisition du cholestérol libre provenant d'autres tissus ou d'autres lipoprotéines et par estérification de ce cholestérol sous l'action de la LCAT ou Lécithin cholestérol acyltransférase (Oram *et al.*, 1987a ; Turpin, 1989).

Les HDL contiennent deux classes principales de particules lipoprotéiques : celles qui contiennent l'apo I et l'apo II et celles qui ne contiennent que l'apo I. Purifiées du plasma par chromatographie d'immunoaffinité séquentielle (Parra *et al.*, 1990), les Lp AI contiennent plus de cholestérol libre que les Lp AII, transportent les protéines impliquées dans le transfert inverse du cholestérol, sous l'action de la CETP ou cholestérol ester transfert protéine et la LCAT (Cheung *et al.* , 1986) et sont, selon Rader *et al.* (1991), catabolisées plus rapidement que les Lp AI : AII.

L'interaction HDL – récepteur membranaire facilite l'efflux du cholestérol libre et son incorporation dans ces lipoprotéines (Oram *et al.* 1985 ; 1987a).

Une forte activité de la CETP permet le transfert du CE des HDL2 vers des lipoprotéines de plus faible densité (VLDL), ce qui permet aux LDL issues du métabolisme intravasculaire des VLDL de participer au retour vers le foie de CE formé dans les HDL (Tall, 1998 ; Lagrost et Gambert, 1992 ; Mezdour *et al.*, 1994).

Le cholestérol estérifié des HDL2 peut également être transféré de manière sélective vers le foie ou les tissus stéroïdogènes au niveau desquels est exprimé un récepteur capable de capter sélectivement le CE – HDL : le SR-BI (Fig. 14, 15). Au niveau hépatique, il a été identifié comme un nouveau membre de la famille des récepteurs dits éboueurs ou « scavenger » de la classe B (Acton *et al.*, 1996 ; Landschultz *et al.*, 1996 ; Johnson *et al.*, 1998).

La LCAT estérifie le cholestérol et la CETP le transfert aux VLDL lesquelles sont métabolisées en IDL puis en LDL. Ces dernières sont captées par le foie via le récepteur LDL (Mezdour *et al*,1994).

Apo AI et apo AII sont les ligands des HDL au niveau des récepteurs membranaires (Oram *et al.*, 1983 ; Barbara *et al.*, 1990). Selon Duverger *et al* (1990), une différence fondamentale existe aujourd'hui entre la Lp AI qui provoque, au contact d'adipocytes en culture, un flux très net
de cholestérol et la Lp AI : AII qui n'induit aucun effet. Le mécanisme moléculaire qui aboutit au transfert inverse du cholestérol montre que le contact Apo AI –récepteur HDL génère la production de second messager et l'activation d'une protéine Kinase C laquelle phosphoryle une protéine X qui assure la translocation du cholestérol intracellulaire vers la membrane. L'ensemble des HDL prend donc en charge le cholestérol membranaire mais seule la Lp AI assure la translocation (Theret *et al.*, 1990).

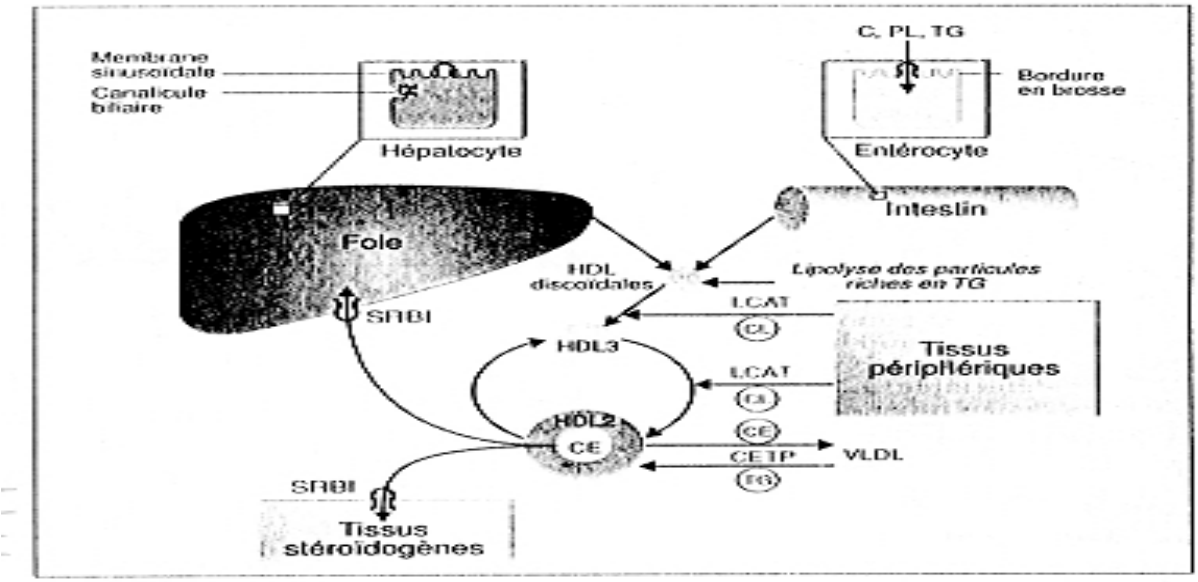


Figure 14 - Expression tissulaire et cellulaire du récepteur des HDL : SR-BI (scavenger receptor class B type I). (Combettes-Souverain *et al.*, 1999). SR-BI est exprimé dans tous les tissus capables de capter sélectivement le CE-HDL : dans le foie , les tissus stroïdogènes, l'intestin,le tissu adipeux et le poumon.

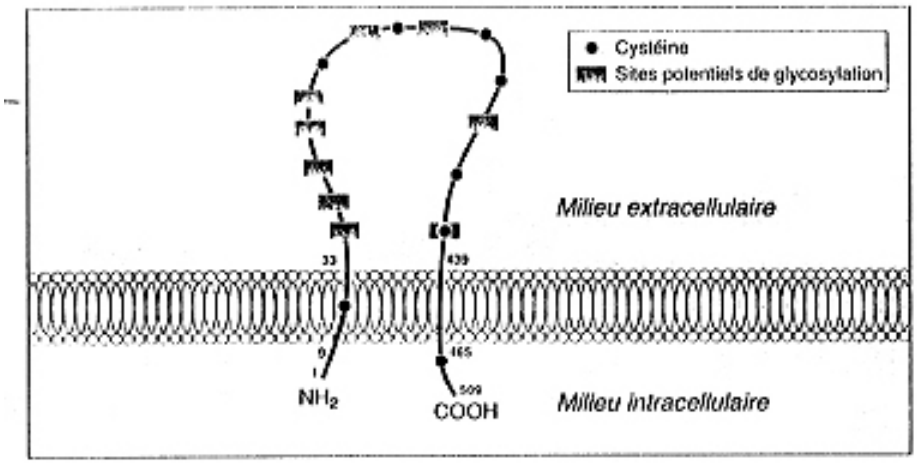


Figure 15 - Représentation schématique du récepteur SR-BI chez le Hamster. (Combettes-Souverain *et al.*, 1999).
C'est une protéine transmembranaire de 509 acides aminés, présente une large boucle extracellulaire. SR-BI est fortement glycosylée et contient de nombreuses cystéines sur la partie extracellulaire.

2. LIPOPROTEINES CONTENANT L'APO B (LDL)

Contrairement aux VLDL dont la taille est trop importante et qui ne sont pas directement athérogènes, les LDL (low density lipoprotein ou lipoprotéines de faible densité) riches en cholestérol estérifié sont porteuses de l'apo B reconnues par des récepteurs membranaires spécifiques des cellules de la périphérie (Habenicht *et al.*, 1980).

Dans les CML, les LDL sont internalisées par la voie des récepteurs (Brown et Goldstein, 1976 ; Goldstein *et al.*, 1985 ; Goldstein et Brown 1987), selon un mécanisme d'endocytose, dans les puits recouverts de clathrine et de protéines d'adaptation (Goldstein *et al.*, 1979 ; Bos *et al.*, 1995). La vésicule d'endocytose recouverte se dénude et se transforme en endosome qui sera dégradé par les lysosomes (Brown et Goldstein 1983 ; Oram *et al.*, 1987b). Ainsi 10 à 15 min après leur fixation, les LDL internalisées sont transmises aux lysosomes où a lieu l'hydrolyse de l'apo B en acides aminés, des esters de cholestérol en acides gras et cholestérol libre lequel est mis à la disposition de la cellule pour la synthèse de ses membranes (Fig. 16). Dans l'endosome, après action de la pompe à protons qui acidifie le contenu, les LDL sont auparavant dissociées des récepteurs lesquels sont recyclés à la surface cellulaire par le processus de rétro-endocytose après un passage dans l'appareil de Golgi (Hobbs *et al.*, 1990 ; Brown et Goldstein, 1997). Ce recyclage des récepteurs LDL est fortement dépendant de la clathrine (Bos *et al.*, 1995) (Fig. 18).

Goldstein et Brown (1975b), Brown *et al.* (1976) montrent le rôle essentiel du récepteur LDL et des hydrolases acides dans l'utilisation métabolique des LDL par les fibroblastes humains en culture. Par ailleurs, la régulation du contenu intracellulaire en cholestérol se fait dans la régulation de l'activité du récepteur LDL (LDLR) qui contrôle le taux d'entrée des LDL (Brown et Goldstein, 1975 ; Russel *et al.*, 1983 ; Brown et Goldstein, 1990b ; Bruckert et Chapman, 1994). L'absence ou la diminution de l'affinité existant entre LDL et LDLR sont dûes essentiellement à deux mutations qui affectent les fonctions des LDLR : la non fixation et la réduction de la fonction du LDLR (Goldstein *et al.*, 1975a ; Varret *et al.*, 1997). Elles caractérisent respectivement l'hypercholestérolémie familiale homozygote et hétérozygote lesquelles induisent une athérosclérose fulgurante (Brown et Goldstein, 1975 ; Goldstein et Brown, 1983 ; Davis *et al.*, 1986 ; Brown et Goldstein, 1992 ; Rabès *et al.*, 1997).

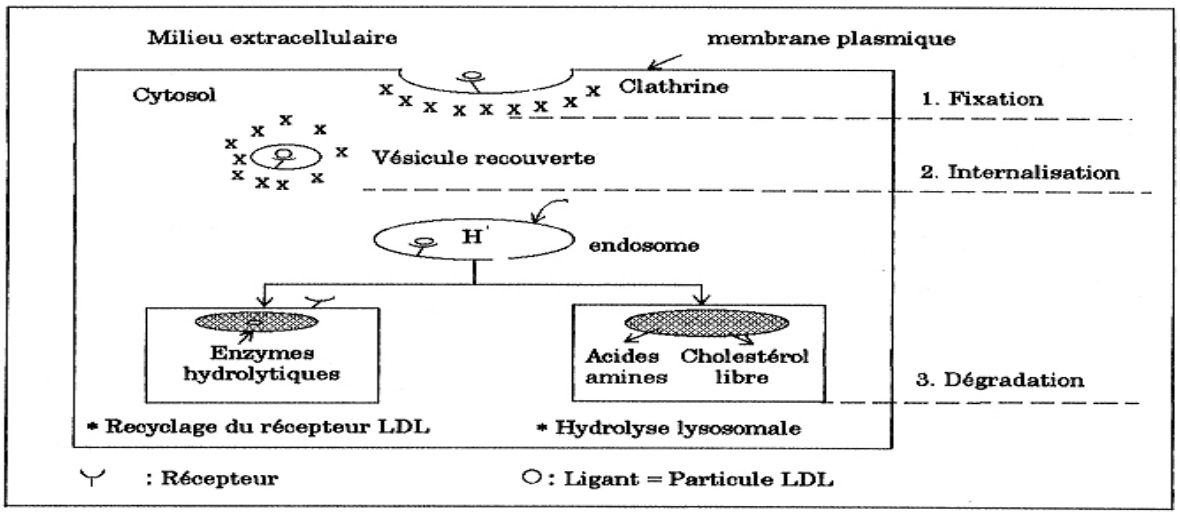


Figure 16 - Internalisation des LDL dans la CML aortique. (Oram *et al.*, 1985).

Les récepteurs des LDL, découverts en 1975 par Brown et Goldstein sur les fibroblastes humains, sont des glycoprotéines purifiées à partir de la glande surrénale de plusieurs espèces animales (bovin, lapin...) (Schneider, 1989). Ce sont des protéines pentapartites de 839 acides aminés constituées de 5 domaines. Le domaine I de fixation du ligand, spécifique à l'apo B et/ou E constitué de 292 résidus amino acides (Esser *et al.*, 1988 ; Varret *et al.*, 1997), le domaine II, homologue du précurseur de l'EGF et le domaine III, riche en chaînes de sucres constituent la fraction extracellulaire (Varret *et al.*, 1997). Le domaine IV est transmembranaire et le domaine V de la région cytoplasmique forme une bande de 50 résidus amino- acides avec en position carboxyterminal, l'alanine (Schneider, 1989 ; Hobbs *et al.*, 1990) (Fig. 17).

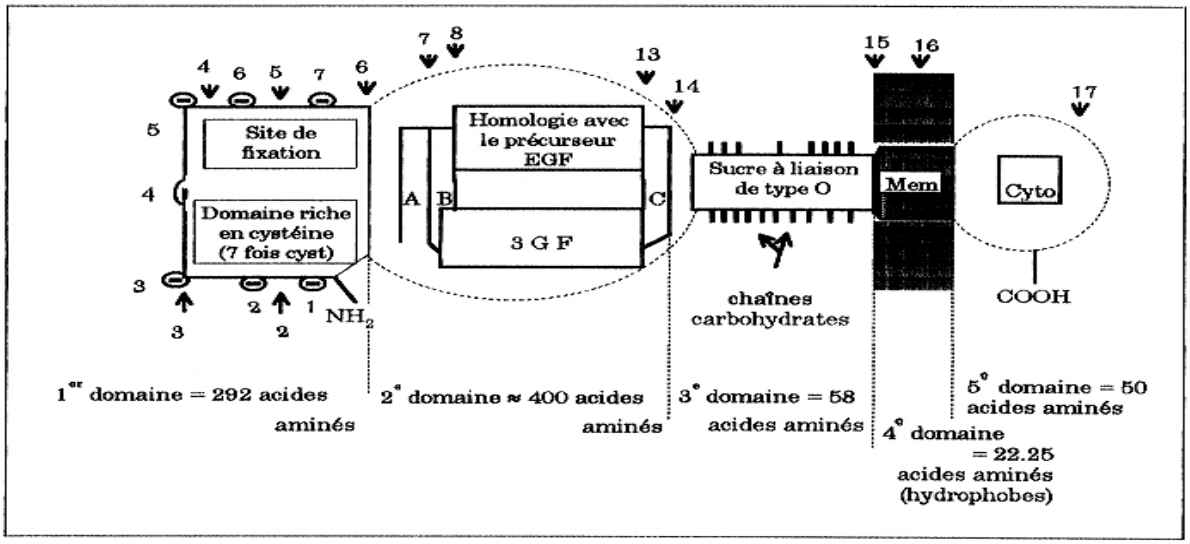


Figure 17 - Schéma du récepteur des LDL avec ses cinq domaines. (Schneider, 1989). Les domaines 1, 2 et 3 sont extracellulaires ; le domaine 4 est intégré à la membrane cytoplasmique et le domaine 5 est cytosolique.

Les mécanismes cellulaires impliqués dans la biosynthèse et la transformation du récepteur LDL (LDLR) ont été étudiés par Goldstein et Brown, (1975 ; Goldstein *et al.*, 1975a, b) ; Oram *et al.* (1985) Goldstein et Brown, (1987). La synthèse du précurseur de LDLR (120 kDa) et sa maturation par modification *et* allongement des chaînes carbohydratées a lieu dans le REG. La protéine mature (600 kDa) est transportée dans l'appareil de Golgi où elle subit, par protéolyse, un cleavage en deux sous unités aux PM approximatifs de 515 et 85 kDa (Hertz *et al.*, 1990). A la surface cellulaire, elle s'insère à la membrane plasmique prête à fixer une lipoparticule LDL (Fig. 18). Saxena et Shipley en 1997 obtiennent, après purification du LDR, sa structure secondaire et tertiaire et son incorporation dans les vésicules d'endocytose par coloration négative.

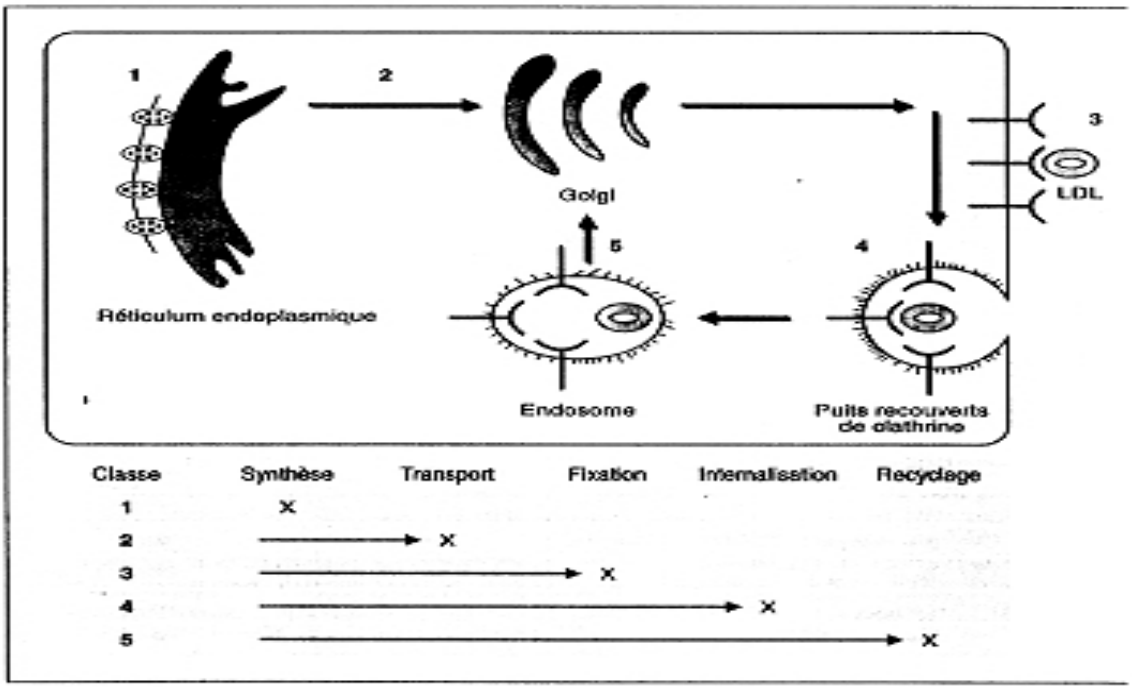


Figure 18 - Synthèse, transport, fixation membranaire et recyclage du récepteur à LDL après son passage dans le Golgi. (Hobbs *et al.*, 1990).

Actuellement, seule la structure de la première séquence répétée du domaine de liaison I, codée par l'exon 2 du gène LDLR, a été étudiée (Daly *et al.*, 1995). Cette séquence forme un noyau hydrophobe et une face à résidus acides dont la triade Ser-Asp-Glu intervient dans la fixation des ligands du récepteur : l'apo B-100 et l'apo E (Daly *et al.*, 1995).

Le gène LDLR, mosaïque de 18 exons (Sudhof *et al.*, 1985), localisé en 19 p13.1-13.3 a une taille de 45kb. La correspondance entre les exons du gène et les domaines protéiques est de nos jours bien définie (Benlian et Loux, 1991) (Fig. 19).

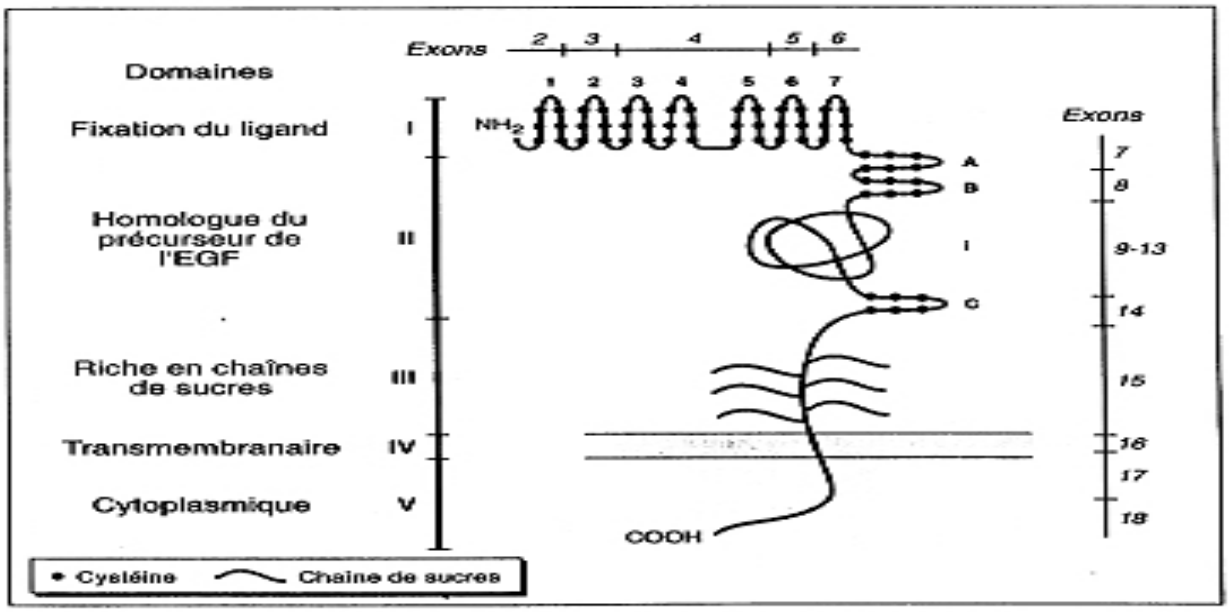


Figure 19 - Correspondance entre les domaines protéiques et les exons du gène LDLR (Hobbs *et al.*, 1990).

Par ailleurs, outre les LDL, la Lp (a) est l'autre lipoprotéine qui favoriserait l'athérogénèse. Découverte par Berg en 1963 ; elle existe sous deux formes (Bartens et Wanner, 1994 ; Van der Hock *et al.*, 1994)

- La Lp (a) riche en ester de cholestérol qui contient l'apo B100 et l'apo (a), reliées par des ponts disulfures.
- La Lp (a) riche en triglycérides, contient l'apo B/E.

La Lp (a) longtemps considérée comme une forme polymorphique des LDL est une particule dont le potentiel d'initier le développement d'une pathologie vasculaire est précoce et incontrôlable (Fruchart, 1993). Ses propriétés pathogéniques résident dans l'Apo (a), protéine associée à l'apo B-100 via un pont disulfure près du N terminal de l'apo B. La séquence d'amino acides déduite de son mRNA montre 80% de coïncidence avec le plasminogène précurseur de la plasmine (protéase sanguine responsable de la dissolution du caillot de fibrine) (Eaton *et al.*, 1987). Le gène de l'apo (a) est localisé sur le chromosome 6 (Frank *et al.*, 1988).

Comme les LDL, la Lp(a) peut traverser l'endothélium, interagit avec les protéoglycannes et sa fixation dans la MEC l'empêche de retourner dans le plasma. Après oxydation, elle est captée par les macrophages les enrichissant en cholestérol (Fruchart, 1993 ; Edward et Harris, 1997). L'accumulation de la Lp (a) dans la paroi artérielle favorise d'une part un environnement antifibrinolytique en se liant au facteur XIIIa et d'autre part la formation de cellules spumeuses ainsi que la prolifération des CML contribuant ainsi à la pathogenèse de l'athérosclérose (Romanic *et al.*, 1998). En revanche, Ishigami *et al.* (1998) attribuent à la Lp (a) par l'Apo E un effet anti-athérogène car cette dernière diminue le cholestérol plasmatique et limite la formation de cellules spumeuses par une baisse de stimulation des mitogènes en activant la protéine kinase.

La paroi artérielle est donc infiltrée en permanence par un courant de LDL/VLDL/Lp(a) et de HDL (Oram *et al.*, 1985 ; Ross, 1986 ; Betteridge,1989) ; le risque cardiovasculaire étant proportionnel à la concentration en cholestérol des LDL et inversement proportionnel à celui des HDL (Brown *et al.*, 1987).

B. VOIES ENZYMATIQUES DE CHOLESTEROL

Selon Oram *et al.*, (1985), la CML possède 4 voies distinctes qui opèrent pour maintenir l'homéostasie du cholestérol. En effet, les CML artérielles « in vivo » ou en culture présentent des voies multienzymatiques qui catalysent le métabolisme du cholestérol (Fig. 20) :

1. *LA VOIE EXOGENE DE DISTRIBUTION*

Elle correspond à une des voies de régulation du cholestérol pouvant être exploitée dans la thérapie de l'athérogenèse (Brown *et al.*, 1987). Elle assure la pénétration du cholestérol estérifié transporté par les LDL. Ces dernières, après fixation sur des sites membranaires spécifiques, synthétisés par la cellule et insérés dans la membrane, sont internalisées par endocytose (Brown et Goldstein, 1976 ; Oram *et al.*, 1985).

٢. *LA VOIE ENDOGENE DE DISTRIBUTION*

Le contrôle de cette voie est assuré par la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A ou HMG CoA réductase qui convertit la HMG CoA en acide mévalonique (Rudney et Russel, 1986 ; Correl et Edwards, 1994). Protéine intégrée de la membrane du réticulum endoplasmique, elle présente son site catalytique dans la fraction hyaloplasmique correspondant à 548 amino acides du côté C terminal (Oram *et al.*, 1985). Le domaine N terminal formé de 339 acides aminés intervient dans la régulation de la synthèse de cholestérol (Goldstein et Brown, 1984 ; Gil *et al.*, 1985).

٣. *LA VOIE EXOGENE DE REJET*

En plus des récepteurs spécifiques des LDL, les membranes des CML artérielles présentent également des récepteurs aux HDL utilisées dans la voie exogène de rejet (Biesbroeck *et al.*, 1983 ; Oram *et al.*, 1983). Ils sont responsables du rejet du cholestérol libre des cellules en fixant réversiblement les HDL. Celles – ci sont le substrat naturel de la Lécithine cholestérol acyl transférase ou LCAT laquelle estérifie l'excès de cholestérol libre capté par les HDL qui le véhiculent vers le foie.

٤. *LA VOIE ENDOGENE DE REJET*

Les esters de cholestérol dans les CML artérielles sont régulés par l'action d'une enzyme microsomiale (l'Acyl-CoA cholestérol Acyl transférase ou ACAT) qui permet à la CML de stocker le cholestérol sous sa forme estérifiée et donc de la protéger d'une suraccumulation nocive de cholestérol libre (Scallen et Sanghvi, 1983 ; Suckling et Stange, 1985). Une deuxième enzyme microsomiale (la cholestérol estérase) intervient dans cette voie et permet l'utilisation du cholestérol libre par la cellule (Oram *et al.*, 1985).

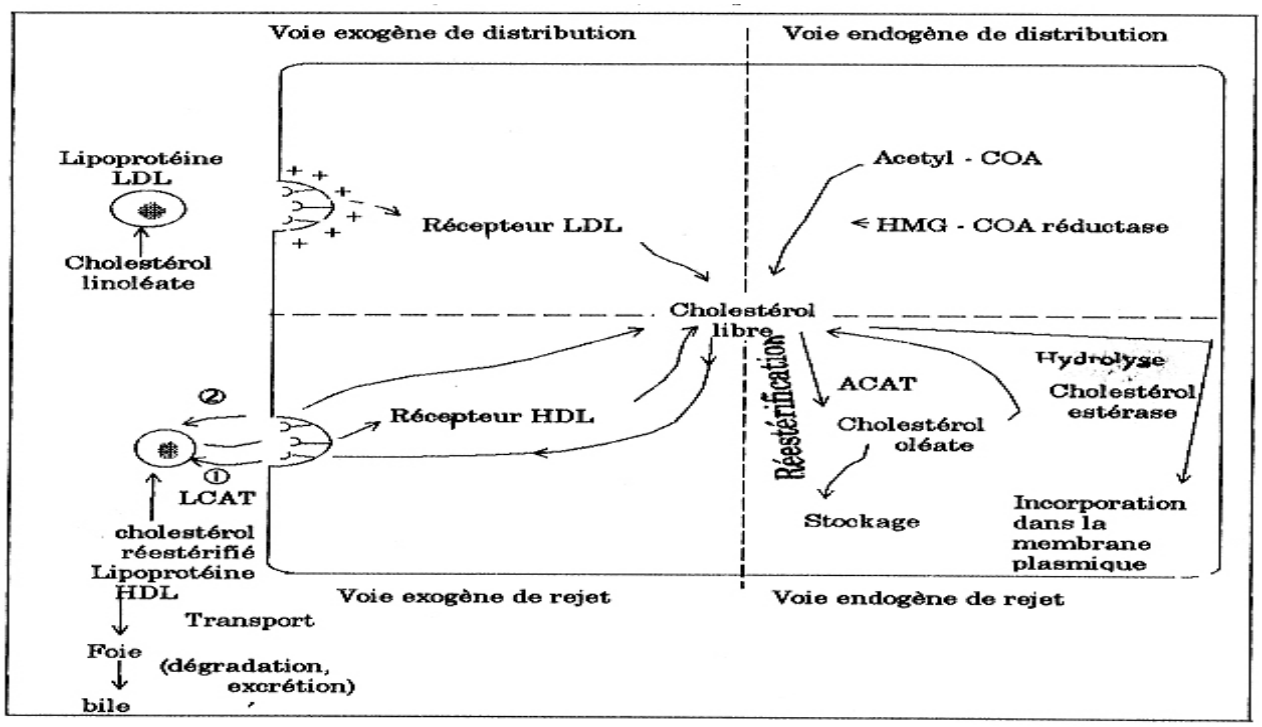


Figure 20 - Voies enzymatiques de régulation du cholestérol. (Oram *et al.*, 1985).

C. OXYDATION DES LDL

Les CML aortiques sont avec les monocytes /macrophages les précurseurs des cellules spumeuses caractéristiques des lésions d'athérosclérose (Ross, 1986). La conversion des CML en cellules spumeuses riches en esters de cholestérol implique une perturbation de l'homéostasie du cholestérol cellulaire ; et donc des altérations de la distribution du cholestérol aux cellules via la voie dépendante ou indépendante des récepteurs aux LDL, des anomalies dans la synthèse de cholestérol ainsi qu'une altération du rejet de cholestérol (Oram *et al.*, 1985 ; Dejager, 1998). Par conséquent, les perturbations du métabolisme lipidique interne des CML joueraient un rôle majeur dans la transformation xanthomateuse (Bourdillon *et al.*, 1976c ; 1991 ; Dussère *et al.*, 1990 ; Pie et Seillan, 1992). Un déséquilibre entre l'apport et l'élimination du cholestérol cellulaire a été observé d'abord au niveau des monocytes/macrophages puis des CML aortiques in vitro (Campbell *et al.*,1987). Un des signes de la lésion d'athérosclérose est l'apparition des stries lipidiques (Ross, 1986) correspondantes aux cellules dont le cytoplasme est riche en vacuoles remplies d'esters de cholestérol ; ce sont des macrophages et des CML appelées à ce stade cellules spumeuses ou « foam cells » (Campbell et Chamley-Campbell, 1981 ; Bourdillon *et al.*, 1991) (Fig. 14).

Le rôle des lipides dans l'évolution de l'athérosclérose est mieux compris de nos jours par l'étude des différentes lipoprotéines intervenant dans les mouvements de cholestérol et qui sont liées au développement de l'athérosclérose (Hadjisky *et al.*, 1991 ; Guyton, 1994 ; Witzium, 1994).

La VLDL qui se transforme en LDL, la Lp (a) qui, après oxydation est fixée par le macrophage et la LDL sont impliquées dans l'afflux de cholestérol et sont athérogènes (Goldstein et Brown, 1977 ; Steinberg *et al.*, 1989).

Le rôle central des LDL dans l'athérogenèse est bien établi. Néanmoins, aucun mécanisme athérogène direct n'a pu être attribué aux LDL à l'état natif, d'où l'hypothèse de modifications oxydatives des LDL dans le tissu artériel pour expliquer leur athérogénicité (Steinberg *et al.*, 1989) affirmée par de solides arguments (Palinsky *et al.*, 1989) (Fig. 21). En effet, des LDL oxydées ainsi que des auto-anticorps anti-LDL oxydées sont retrouvés dans les lésions athéroscléreuses et non dans la paroi normale, associés aux CML et aux macrophages spumeux de la plaque (Ylä-Hertiuala *et al.*, 1994).

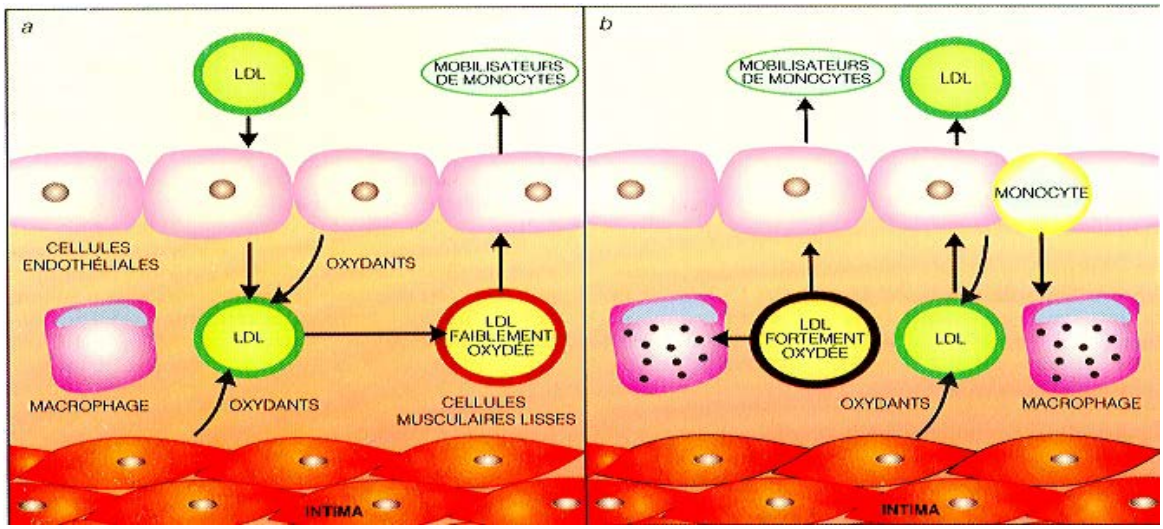


Figure 21 - Oxydation progressive des LDL au contact des CML, des macrophages et des cellules endothéliales dans la sous intima. (Fruchart, 1993).

Lors du processus athéroscléreux, les CML seraient capables de capter et d'accumuler des esters de cholesterol via une voie indépendante des récepteurs LDL (Tertov *et al.*, 1992) (Fig. 22). Celle –ci serait particulièrement active lorsque le taux des LDL circulantes est élevé. Par ailleurs, Brown et Goldstein, (1983) observent une athérosclérose accélérée chez des sujets présentant une déficience en récepteurs spécifiques aux apoprotéines B et E. Les mêmes auteurs démontrent que la captation des lipoproteines à apo B par les macrophages se fait également en dehors des récepteurs B et E. Ces lipoprotéines natives au départ subissent différents degrés d'oxydation en particulier les LDL modifiées de façon minime (MM-LDL) et les LDL oxydées de façon extensive (Oram *et al.*, 1985 ; Brown et Goldstein, 1990a ; Dejager, 1998). Les premières contiennent un très faible taux d'aldéhydes et sont toujours reconnues par les LDL-récepteurs alors que les secondes ont subi des altérations de l'Apo B par des péroxydations successives, ne sont plus reconnues par les LDL-récepteurs (Brown et Goldstein, 1990b) ; Steinbrecher, 1999).

Le premier effet des MM-LDL est l'induction d'une adhérence accrue des monocytes et des lymphocytes T par stimulation de molécules d'adhésion spécifiques X-LAM à la surface de l'endothélium et d'un chimiotactisme puissant pour les monocytes par induction de protéines telles que les MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) et les MCSF (macrophage colony-stimulating factor) (Quinn *et al.*, 1988 ; Ross, 1995) (Fig. 23)

Les monocytes adhérés à l'endothélium, passent entre les cellules endothéliales par diapédèse et se différencient en macrophages dans le sous-endothélium stimulant la migration et la prolifération des CML (Dejager, 1998).

A un stade ultérieur, où elles s'oxydent fortement au contact des macrophages et des CML, les LDL sont reconnues et captées par les macrophages grâce au récepteur « scavenger » (Haraki *et al.*, 1995), cloné et séquencé par Kodama *et al.*, (1990), et internalisées par les CML "*via*" la voie indépendante des LDL-récepteurs induisant une accumulation massive de cholestérol dans les CML et les macrophages les transformant en cellules spumeuses (Oram *et al.*,1985, Hadjiski *et al.*,1991 ; Fruchart, 1993) (Fig. 22, 23). Ces dernières sont un élément central des lésions puisqu'elles constituent les stries lipidiques (Falk *et al.*, 1995).

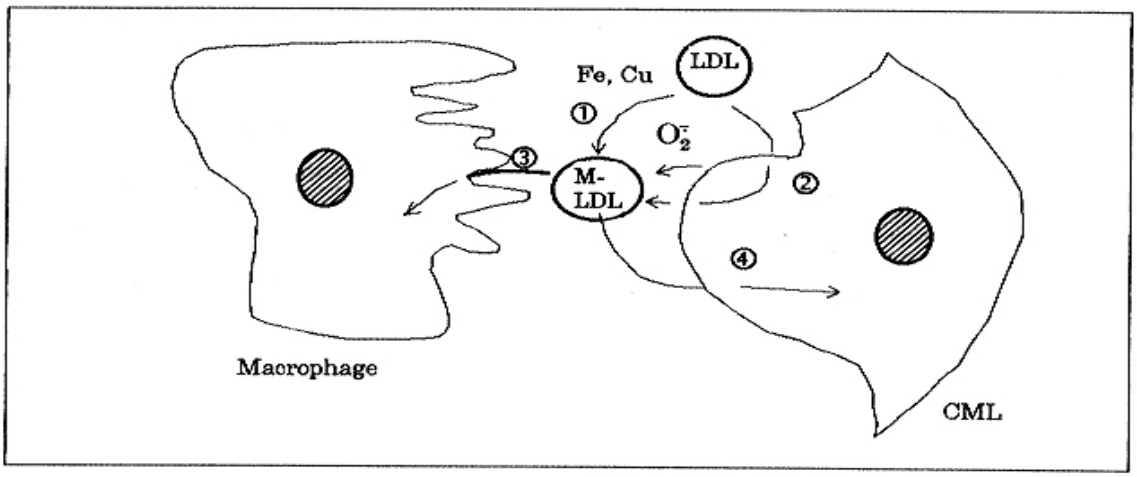


Figure 22 - Captation des LDL oxydées par les macrophages et les CML (Oram *et al.*, 1985).

(١) : oxydation des LDL dans la MEC

(٢) : oxydation des LDL dans les CML par péroxydations successives induisant la dégradation des apo B100 en peptides oxydés

(٣) : internalisation des LDL oxydées (M LDL ou modified LDL) dans le macrophage par le récepteur « scavenger » qui reconnaît les LDL altérées

(Σ) : internalisation des LDL oxydées dans les CML par la voie indépendante des récepteurs à LDL

Les LDL oxydées sont cytotoxiques pour toutes les cellules de la paroi artérielle (inhibition de la mobilité des cellules endothéliales dans la réparation des lésions, amplification du processus inflammatoire vis à vis du macrophage, altération de la vasomotricité des CML) (Fuster *et al.*, 1992). Elles inhibent la mobilité des macrophages, entraînant l'adhésion des plaquettes et l'évolution vers une lésion plus avancée (Kodama *et al.*, 1990 ; ...). Elles jouent un rôle dans la réponse immune activant certains lymphocytes et permettant la sécrétion de cytokines (Stemme *et al.*, 1995)

La présence de LDL modifiées a été observée dans la circulation sanguine de rats des sables diabétiques soumis à un régime hypercalorique hypercholestérolé (Marquié *et al*, 1994).

Les travaux de Maggi *et al.*, (1994) montrent que des malades atteints de maladies coronariennes présentent une hausse du cholestérol-LDL et d'anticorps–anti LDL oxydées. En revanche, le taux du cholestérol-HDL diminue.

Les LDL semblent donc tenir un rôle décisif aussi bien lors des phases initiales conduisant aux stries lipidiques que dans les événements tardifs qui font basculer l'athérosclérose - lésion vers l'athérosclérose – maladie (Fruchart, 1993 ; Dejager, 1998) (Fig. 23).

Chez les diabétiques, l'athérosclérose est accélérée car d'une part la fraction LDL est augmentée et d'autre part, la fraction HDL est diminuée (Maggi *et al.*, 1994).

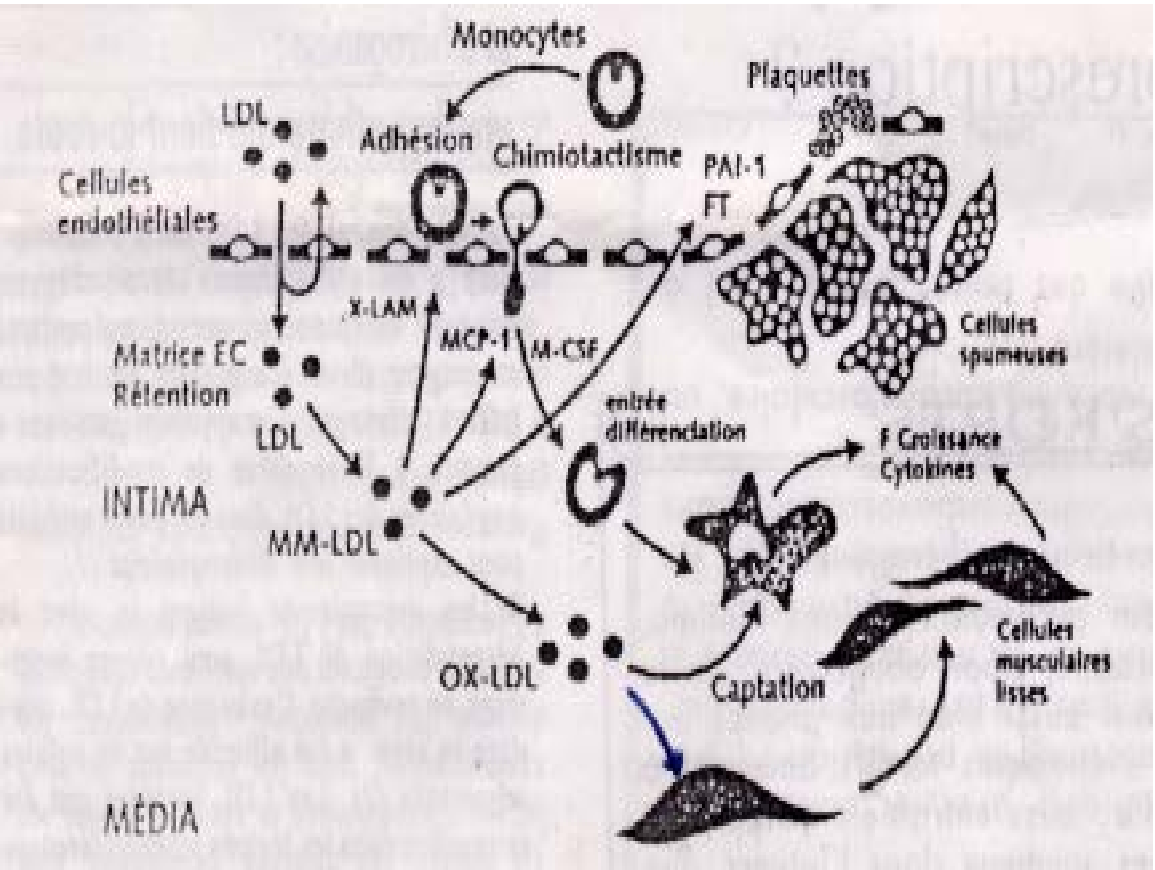


Figure 23 - Conversion des CML et des macrophages en cellules spumeuses. (Dejager, 1998).

D. REGULATION ET THERAPEUTIQUE

Les mécanismes de régulation intracellulaire du cholestérol fonctionnent grâce aux systèmes enzymatiques détaillés par Oram *et al.*, (1985). Ces mécanismes peuvent être incriminés dans la transformation spumeuse des macrophages et des CML aortiques (Dussère *et al.*, 1990 ; Bourdillon *et al.*, 1991). « *In vitro* », Nishide *et al.*, (1992) constatent que les CML seules n'accumulent pas de cholestérol. En revanche en présence de macrophages, elles accumulent des esters de cholestérol provenant de βVLDL incubées dans le milieu. D'après Schreiber *et al.* (1992), des CML aortiques néonatales incubées, pendant un mois, en présence de βVLDL accumulent du cholestérol et présentent les caractéristiques des cellules d'une plaque athéromateuse.

Par ailleurs, la calmoduline Ca^{++} dépendante et/ou la protéine kinase C récepteur de certains facteurs de croissance comme le PDGF semblent jouer un rôle crucial dans l'athérogenèse expérimentale (Meta et Kaul, 1990) par leur influence en particulier de la protéine kinase C sur la régulation de la croissance et de la différenciation des CML (Mata et Lopez Fanne., 1997 ; Wang *et al.*, 1997).

Le mévalonate et autres intermédiaires de la synthèse de cholestérol sont indispensables à la prolifération cellulaire car l'administration de drogues affectant la voie de ces métabolites inhibent « *in-vitro* » la migration et la prolifération cellulaire. Pour cela, ils seraient considérés comme des agents anti-athérosclérotiques potentiels (Corsini *et al*, 1995). En effet certains inhibiteurs de la HMG CoA réductase diminuent la prolifération des CML (Corsini *et al.*, 1997 ; Igarashi *et al.*, 1997) et exercent un effet antiathérosclérotique direct sur la paroi artérielle (Krause et Newton, 1991 ; Bellosta *et al.*, 1998) ; ils réduisent l'épaississement de la néo-intima en inhibant l'accumulation de la MEC (Kitahara *et al.*, 1998). Ils diminuent par ailleurs, l'adhésion des monocytes à l'endothélium (Weber *et al.*, 1997). D'autres facteurs contribueraient à contrôler la formation de la lésion et à réduire les facteurs de risque : ce sont la baisse du cholestérol plasmatique et l'utilisation d'antagonistes calciques qui non seulement diminuent la pression sanguine mais interfèrent également avec quelques réactions, comme l'inhibition de la protéine kinase C, impliquée dans la formation de la lésion athéroscléreuse (Nayler, 1994 ; Van der Geer *et al.*, 1994).

De nombreuses études épidémiologiques ont montré l'existence d'une relation inverse entre la concentration plasmatique et/ou l'apport diététique d'antioxydants et les maladies coronariennes (Rimm *et al.*, 1993 ; Stampfer *et al.*, 1993) ; association expliquée par l'importance des phénomènes oxydatifs dans la physiopathologie de l'athérosclérose (Witzium, 1994).

« *In vitro* », une supplémentation en antioxydants peut augmenter la résistance des LDL à une oxydation par une inhibition de la péroxydation lipidique au sein des LDL. L'apport diététique d'antioxydants tels que la vitamine E, la vitamine C et le β carotène semble favoriser une résistance à l'oxydation des LDL (Gey et Fuska, 1989 ; Fruchart, 1993).

Par ailleurs, l'objectif thérapeutique en prévention secondaire devrait non plus seulement diminuer la concentration des lipides circulants (de Lorgeril et Salen, 2000) mais empêcher l'inflammation lésionnelle et la rupture de la plaque. Cet effet est obtenu par une modification qualitative de la constitution biochimique des lipides circulants et intralésionnels dans le sens anti-oxydant et anti-inflammatoire (Tsimikas et Reaven, 1998).

De nos jours, il reste à organiser avec précision des essais thérapeutiques destinés à vérifier l'efficacité d'une thérapeutique anti-oxydante, anti-inflammatoire et diététique comme :

1. L'utilisation de certains traitements médicamenteux (les statines) aux propriétés hypolipémiantes, anti-coagulantes et anti-inflammatoires (Kearney et Fitzerald, 1999 ; Strandberg *et al.*, 1999).

2. L'utilisation de cytokines anti-inflammatoires telle l'IL 10. Comme toute réaction inflammatoire , l'athérosclérose s'accompagne de la production de cytokines anti-inflammatoires (IL 4 , IL 3, TGFβ et en particulier IL 10) qui participent à la résolution de l'inflammation (Tedgui et Mallat, 2000). L'IL 10 régule de façon autocrine la sécrétion macrophagique des cytokines pro-inflammatoires (Berg *et al* ., 1995). De plus, elle pourrait être considérée comme une réelle cible thérapeutique car elle inhibe ou stimule l'expression de certaines métalloprotéïnases qui déstabilisent les lésions (Lacraz *et al.*, 1995).

Ces propriétés font de l'IL 10 une cytokine potentiellement anti-athérogène donc de protection contre l'athérosclérose (Mallat *et al.*, 1999 ; Pinderski *et al.* ,1999). Toutefois, son utilisation doit être envisagée avec prudence car elle est également immuno-modulatrice ; elle stimule la prolifération des lymphocytes B et la production d'anticorps dirigés contre les épitopes de LDL oxydées qui pourraient aggraver le processus athéroscléreux (Libby et Hansson, 1991).

3. Grâce aux études nutritionnelles des deux dernières décennies (Krombout, 1999), il est apparu que si le cholestérol est un prédicateur de risque de décès cardiaque, d'autres facteurs (autres que le diabète, le tabac, le stress, l'HTA) liés essentiellement à l'alimentation comme la consommation de graisses saturées (déterminent positif au niveau du cholestérol sérique) sont étroitement associés aux risques d'athérosclérose (Keys, 1980 ; de Lorgéril et Salen, 2000). Par conséquent, un régime pauvre en acides gras saturés (déterminants positifs du cholestérol sérique), pauvre en acides gras polyinsaturés (sensibles à l'oxydation) (Mata *et al.*, 1997 ; Krombout *et al.*, 1999) mais riche en antioxydants naturels et également en acides gras monoinsaturés (résistants à l'oxydation) semble être un régime approprié pour empêcher les phénomènes de péroxydation lipidique des LDL, des lipides des membranes cellulaires et des plaques athéroscléreuses (Grundy et Denke, 1990 ; Mata *et al.*, 1996 ; Tsimikas et Reaven, 1998 ; Davies, 1999).

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL BIOLOGIQUE

Pour cette étude, deux espèces de rongeurs ont été utilisées : le rat de laboratoire (*Rattus norvegicus*) et le rat des sables (*Psammomys obesus*).

I. RAT DE LABORATOIRE : *Rattus norvegicus*

1. *ORIGINE DU RAT DE LABORATOIRE NORMAL*

Les rats de laboratoire, provenant de l'Institut Pasteur d'Alger (Kouba), sont âgés de 5 à 10 semaines et pèsent en moyenne 250 g. Dès leur arrivée, ils sont répartis dans des cages par groupes de deux ; ils reçoivent quotidiennement un régime standard de laboratoire fourni par l'ONAB et de l'eau "*ad libitum*".

Composition centésimale du régime standard de laboratoire (%)

- Eau
- Matières minérales
- matières protéiques
- Matières grasses
- Sucre totaux
- Lignine
- Hémicellulose
- Cellulose
- indéterminé

2. EVOLUTION DU DIABETE INSULINODEPENDANT CHEZ RATTUS NORVEGICUS APRES UNE DOSE UNIQUE DE STREPTOZOTOCINE (TAB. II).

Ces travaux ont été réalisés par certains chercheurs du laboratoire. EL LEMDANI F ; BOUDERBA S ; OMARI N ; OTHMANI K ; KHEMICI D ; KHALKHAL A.

Les animaux ayant subi une injection de streptozotocine à 60 mg/Kg et suivis pendant 4 semaines, développent un diabète de type I ou diabète insulino dépendant. A l'autopsie, l'observation du pancréas endocrine a montré une diminution de la taille des ilôts de Langerhans ainsi que leur vacuolisation traduisant un effondrement de l'insuline immunoréactive observée par de nombreux auteurs. L'évaluation du poids corporel, de la glycémie, du cholestérol et des triglycérides est hebdomadaire. Les animaux diabétiques sont sacrifiés à la 5ème semaine de la maladie où la polydipsie et la polyurie sont très importantes.

Dès les premiers jours qui suivent l'injection, la glycémie s'élève considérablement, 5.0 ± 0.5 g/l vs 1.2 ± 0.1 g/l chez les témoins. Nous assistons conjointement à une chute pondérale de 10% due à la carence insulinique , elle devient plus importante après la 5ème semaine puisqu'elle atteint 18.2%. La perte totale du tissu adipeux observée lors de l'autopsie traduit l'état de mobilisation intense des réserves adipeuses. Les lipides plasmatiques augmentent après la première semaine qui suit l'injection. Ainsi à la fin de l'expérimentation, le cholestérol total et les triglycérides augmentent statistiquement dans les rapports respectifs (x 2.8) et (x 2.7).

En définitive, R.n devenu diabétique insulino dépendant est caractérisé par une carence insulinique observée par de nombreux auteurs, induisant une chute de poids qui s'aggrave au delà de la 5ème semaine. Une hyperglycémie exagérée est observée dès les

premiers jours qui suivent l'injection ; l'hyperlipidémie est plus tardive mais elle est statistiquement significative comparativement aux témoins.

TABLEAU II Evolution sur 4 semaines du poids corporel et de certains paramètres biochimiques chez *Rattus norvegicus* (R.n) rendu diabétique insulino dépendant par une injection de streptozotocine à 60 mg/kg.

Les animaux sont sacrifiés 5 semaines après l'injection.
Les valeurs sont les moyennes ± l'écart type.
Le degré de signification est calculé pour les valeurs moyennes des diabétiques comparées à celles des témoins correspondants : (*) p < 0.05, (**) p < 0.01, (***) p < 0.001, (****) p < 0.0001.

	Semaines				
	T0	T1	T2	T3	T4
Poids corporel (g)	174,7 ± 3,9	171,2 ± 6,6	167,0 ± 4,2	164,8 ± 6,5	156,3 ± 5,4 *
Glucose (g/l)	1,2 ± 0,1	5,0 ± 0,5 ****	4,8 ± 0,3 ****	5,4 ± 0,3 ****	5,9 ± 0,4 ****
Cholesterol total (mg/100 ml)	60 ± 0,04	70 ± 0,04 *	90 ± 0,1 **	120 ± 0,3 ***	170 ± 0,3 ***
Triglycérides (mg/100ml)	90,0 ± 0,2	140 ± 0,2 ***	130 ± 0,2 **	150 ± 0,1 ***	250 ± 0,3 ****

II. RAT DES SABLES : *Psammomys obesus*

1. ORIGINE DU RAT DES SABLES NORMAL

Le rat des sables mis en captivité vit, au contraire du rat de laboratoire, seul dans une cage munie d'un abri en bois simulant son terrier. C'est un rongeur déserticole natif de la région de Béni-Abbès, dans le Sud Ouest Algérien (wilaya de Béchar, 30°7 de latitude Nord et 2°10 de longitude ouest). Cette une espèce à activité diurne appartenient à la famille des *Muridés* et à la sous famille des *Gerbillidés*. Il a une espérance de vie de 3 ans et se nourrit exclusivement de plantes halophiles, riches en eau et en sels minéraux, de la famille des *Chénopodiacées* dont *Traganum nudatum*, *Suaeda mollis* et *Salsola foetida* (Daly, 1973).

Composition centésimale du régime naturel (%)

- Eau 80
- Matières minérales 6,86
- matières protéiques 3,53
- Matières grasses 0,4
- Sucre totaux 0,18
- Lignine 1,12
- Hémicellulose 2,62
- Cellulose 2,23
- indéterminé 2,27

2. EVOLUTION DU SYNDROME DIABETIQUE CHEZ PSAMMOMYS OBESUS (P.o) SOUMIS A UN REGIME HYPERCALORIQUE PENDANT 6 MOIS.

Le rat des sables soumis à un stress nutritionnel, dû à l'instauration d'un régime de laboratoire riche en carbohydrates, développe une obésité puis un diabète non-insulino-

dépendant (DNID) parfaitement standardisé dans notre laboratoire (Marquié, 1980 ; Dahmani, 1981 ; Benazzoug, 1981 ; Mahtout, 1981 ; Bouguerra, 1985 ; Bouderba, 1985 ; Khémici, 1985 ; Koceir, 1985).

Composition centésimale du régime hypercalorique (%)

- Glucides 47,4
- Protides 25
- Lipides 7,5
- Sels minéraux 7,1
- Cellulose brute 4
- Humidité 9
- Vitamines E, A, D_3

La surcharge calorique de l'ordre de 32,5kg/j induit, après un mois et demi, une obésité caractérisée par une élévation de 44% du poids corporel, une hyperinsulinémie et une normoglycémie chez 85% des animaux (Fig.24). Après 3 mois de régime standard, 40% des rats des sables devenus obèses présentent des troubles métaboliques caractéristiques du DNID avec hyperglycémie, hyperinsulinémiie et hyperlipidémie. Au stade ultime de la maladie, après 6 mois de régime standard, 70% des animaux diabétiques développent un DID (Fig. 16). Pour éviter l'acido-cétose une thérapeutique insulinique est instaurée.

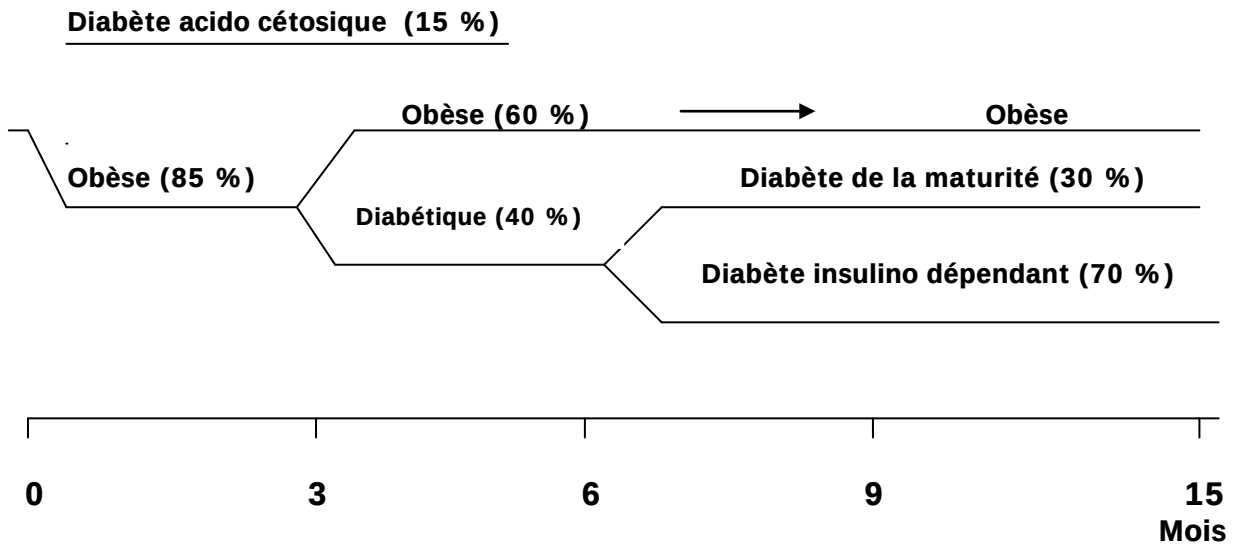


Figure 24 - Evolution du syndrome diabétique chez le rat des sables soumis à un régime hypercalorique (Marquié *et al.*, 1980a).

Les résultats se rapportant à notre expérimentation sont indiqués dans le tableau III. Après 10 à 15 jours d'adaptation au laboratoire, les rats des sables sont soumis au régime standard de laboratoire et à de l'eau salée donnée *ad libitum.*

Dans les semaines qui suivent leur captivité et l'instauration du régime hypercalorique riche en carbohydrates et en extractif non azoté, ils développent une augmentation pondérale sensible, 92.2 ± 3.9 g contre 77.7 ± 4.4 g chez les témoins correspondants. L'obésité se développe mais les animaux sont toujours normoglycémiques. L'insuline égale à 25.2 ± 5.9 µU/ml avant l'institution du régime, s'élève fortement et atteint 222.0 ± 26.1 mg/100 ml après 6 mois de régime. A partir du 3ème mois, l'hyperglycémie s'installe ; elle est de 213.5 g/l au 6ème mois. Pour ce qui est des lipides plasmatiques, l'évaluation de cholestérol libre et estérifié indique une augmentation significative des deux fractions en particulier celle estérifiée qui est de 71.3 ± 8.9 mg/100 ml au 6ème mois contre 34.3 ± 4.7

mg/100 ml chez les témoins correspondants. Ce sont surtout les triglycérides qui augmentent le plus puisqu'ils atteignent 233.6 ± 31.5 mg/100 ml contre 68.3 ± 6.5 mg/100 ml chez les témoins correspondants.

En définitive, l'ensemble des manifestations que sont l'obésité, l'hyperinsulinémie, l'hyperglycémie, l'hyperlipidémie sont caractéristiques du diabète non insulinodépendant. Les études morphologiques et ultrastructurales des ilôts de Langerhans du pancréas endocrine ont permis de confirmer les différents états pathologiques décrits chez Psammomys obesus (Dahmani, 1981 ; Petkov et al., 1981). Il en est de même pour la stéatose hépatique et la surcharge glycogénique observées dans les travaux antérieurs du laboratoire.

TABLEAU III Evolution du poids corporel et de certains paramètres biochimiques chez *Psammomys obesus* rendu diabétique non insulino dépendant par un régime hypercalorique.

Les animaux sont sacrifiés après six mois de régime.
Les valeurs sont les moyennes ± l'écart type.
Le degré de signification est calculé pour les valeurs moyennes des diabétiques comparées à celles des témoins correspondants : (*) $p < 0.05$, (***) $p < 0.001$, (****) $p < 0.0001$.

temps de captivité	0 Mois	6 Mois	
Nourriture en captivité	Régime naturel groupe témoin	Régime naturel groupe témoin	Régime hypercalorique groupe diabétique
Poids corporel (g)	77,7 ± 4,4	92,2 ± 3,9 *	114,7 ± 9,6 ***
Glucose (mg/100 ml)	60,2 ± 5,1	69,0 ± 7,0 *	213,5 ± 21,2 ****
Insuline (µU/ml)	25,2 ± 5,9	37,3 ± 7,1 *	222,0 ± 26,1 ****
Cholesterol estérifié (mg/100 ml)	34,3 ± 4,7	45,2 ± 5,5 *	71,3 ± 8,9 ****
Cholesterol libre (mg/100 ml)	17,4 ± 2,8	22,8 ± 2,7 *	38,5 ± 7,2 ****
Triglycérides (mg/100ml)	68,3 ± 6,5	77,4 ± 6,2 *	233,6 ± 31,5 ****

METHODES

I. CULTURE CELLULAIRE

De nombreuses cellules en culture dont les CML aortiques présentent une grande motilité car elles sont capables de migrer à partir d'un fragment de tissu qui, très rapidement sera désorganisé en cellules individuelles. Cette forme de mise en culture correspond à la technique d'explantation décrite pour la première fois par Ross en 1971. La deuxième technique dite enzymatique consiste d'abord à isoler les cellules avant leur mise en culture (Chamley *et al.*, 1979).

Dans des conditions de culture adéquates, les cellules se multiplient jusqu'à former un tapis cellulaire ; c'est la primoculture ou lignée primaire. Les cellules confluentes subissent alors «un passage» après trypsinisation (détachement des cellules de leur support par la trypsine). Remises en suspension, les cellules sont inoculées dans de nouveaux flacons de culture ; le réensemencement des cellules se fait chaque fois que la confluence est atteinte. Après leur premier passage, les différentes subcultures sont dites secondaires (Fig. 25). Certaines cellules développent la capacité d'être sous-cultivées «*in vitro*» indéfiniment ; de telles lignées subissent une transformation spontanée dans le temps et

sont appelées lignées cellulaires continues ou établies. Lors du processus de transformation, les cellules perdent la majorité de leur fonction et se spécialisent dans l'expression d'une propriété qui leur devient spécifique. Bourdillon *et al.*, (1977) ont montré que les CML aortiques deviennent des cellules établies au-delà du 50ème passage. La sénescence et la mort caractérisent d'autres types de cellules.

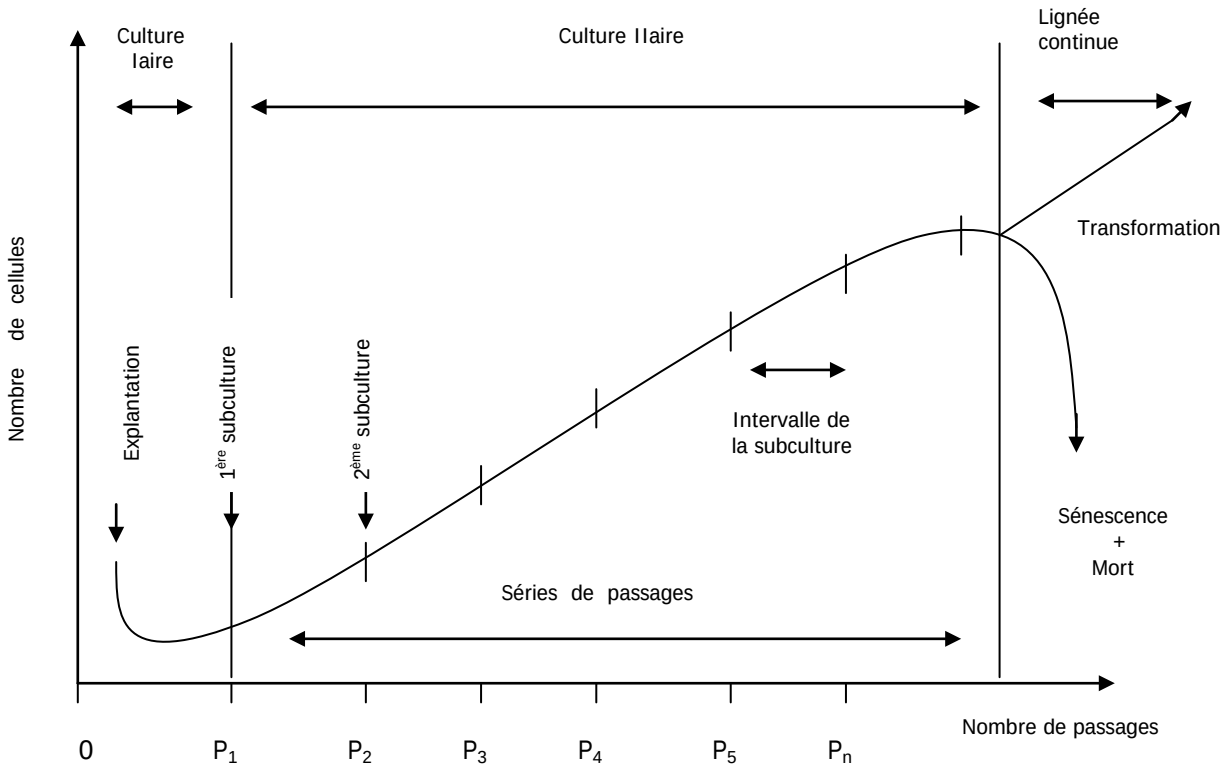


Figure 25 - Mise en culture par la méthode d'explantation. (D'après Hayflick, 1965).

A. MISE EN CULTURE DES CML AORTIQUES (FIG. 26)

La nécessité de réaliser des cultures de CML s'est accrue car ces dernières sont considérées comme un modèle cellulaire de choix pour mieux comprendre les origines et les causes du développement du processus athéroscléreux (Hadjisky *et al.*, 1991)

En utilisant la technique des explants, Ross (1971) fut le premier à réussir le maintien et la multiplicité de ces cellules en culture. La technique de culture que nous avons adoptée est celle sus-citée modifiée par Bourdillon *et al.*, (1977).

Par ailleurs, l'intérêt apporté à la culture du myocyte aortique du rat des sables a été motivé à la suite de plusieurs résultats obtenus au sein de notre laboratoire et qui ont montré que le rat des sables est un modèle expérimental original pour l'étude des complications vasculaires et dégénératives du syndrome diabétique. En effet, la sensibilité du rat des sables face à une surcharge calorique est marquée par une altération des cellules insulaires du pancréas (Dahmani, 1981), des capillaires de la peau et des glomérules rénaux (Benazzoug, 1981) mais également par une altération de la paroi aortique (Mahtout, 1981).

Après anesthésie à l'urethane (20%, 0,4ml/100g de poids corporel), l'aorte thoracique comprise entre le cœur et le diaphragme est prélevée dans des conditions stériles

(Pl. I ; Fig. 1). Elle est placée dans une boîte de pétri contenant du milieu de culture (milieu minimum de Eagle modifié par Dubelco, Gibco) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Sigma), 1% de L glutamine 200mM (Gibco), 1% d'antibiotiques (streptomycine 50 µg/ml, penicilline 50 UI/ml Gibco) , 5,7% de bicarbonate de sodium et 5% d'hépès. L'aorte subit alors une incubation de 30min à 37°c dans une solution de Hank's à 10% qui contient 1% de collagénase (type IA, Sigma). Cette étape facilite le détachement de l'adventice (Pl. I ; Fig. 2) et l'élimination systématique de l'endothélium. La média (Pl. I ; Fig. 3) est alors fragmentée en explants (anneaux de 1mm d'épaisseur ou de fragments de 1 à 3 mm^2) (Pl. I ; Fig. 4, 5) lesquels sont déposés sur le support de flacons de culture (flask, Nunk) qui contiennent chacun 2.5 ml de DMEM à 15 %. Pour adhérer à leur support, les explants sont laissés pendant 10 à 15mn en position verticale puis placés dans un incubateur à 37°c sous atmosphère constituée de 95% d'air et 5% de CO_2.

Au-delà de la 1ère semaine, le milieu est renouvelé deux fois par semaine. A confluence et avant d'effectuer la trypsinisation (trypsine 0,08%, GIBCO), les CML sont rincées deux fois au PBS 10% pour éliminer toute trace de SVF qui entrave l'action de la trypsine. La suspension cellulaire obtenue est ensemencée à volume égal dans plusieurs flacons ; un passage est réalisé.

Pour cette étude, les CML sont utilisées à leur 4ème passage dit précoce ainsi qu'à leurs deux états phénotypiques : synthétique en phase de prolifération et contractile à post confluence.

B. CONSERVATION DES CELLULES

La culture de cellules, difficiles à entretenir, nécessite la préservation rapide de ce type de matériel. Ainsi la congélation consiste à constituer une réserve, à protéger les cellules contre des modifications de leur patrimoine génétique, à éviter le vieillissement, les risques de contamination …(Ronot, 1990).

Dans ce but, une conservation de longue durée est obtenue par cryopréservation à très basse température, –180°C dans l'azote liquide. Pour une viabilité maximum post-congélation, les cellules en culture sont traitées à confluence et après un changement de milieu la veille de la congélation.

Au moment de la congélation, après action de la trypsine à 0.8 % les cellules détachées de leur support, sont en suspension, dispersées dans un milieu contenant 20% de SVF et 7% d'agent cryoprotecteur (Diméthyl sulfoxide ou DMSO). La suspension est répartie dans des cryotubes mentionnant le type cellulaire, le nombre de passages, la date de congélation et autres renseignements importants. Lorsque les cryotubes ont atteint une température comprise entre -70 et -100°C, ils sont rapidement transférés dans l'azote liquide. La méthode permet une conservation des cellules et de leurs fonctions pendant plusieurs années (Hay, 1986 ; Ronot, 1990).

Si la congélation est progressive, la décongélation doit en revanche être rapide pour éliminer le plus rapidement l'agent cryoprotecteur toxique à 37°c.

Le cryotube décongelé à 37°c est stérilisé à l'alcool. La suspension cellulaire est centrifugée, le culot est remis en suspension dans un milieu d'incubation approprié et dans les conditions de culture exigées (milieu d'incubation enrichi en SVF, température à 37° C, atmosphère à 95% d'air et 5% de CO_2).

Planche I Isolement de la média aortique et confection des explants

Fig. 1– Isolement de l'aorte thoracique. Vue de l'extérieur montrant la tunique externe : l'adventice (A)

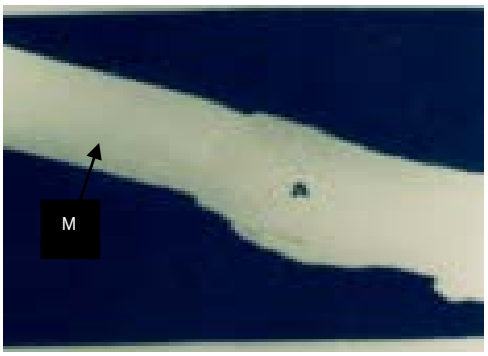


Fig. 2 – Détachement de l'adventice après action de la collagénase à 0.1% et mise à nu de la média (M)

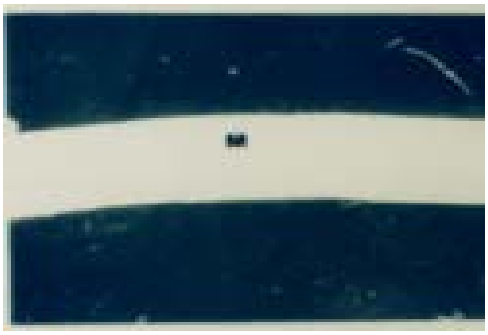
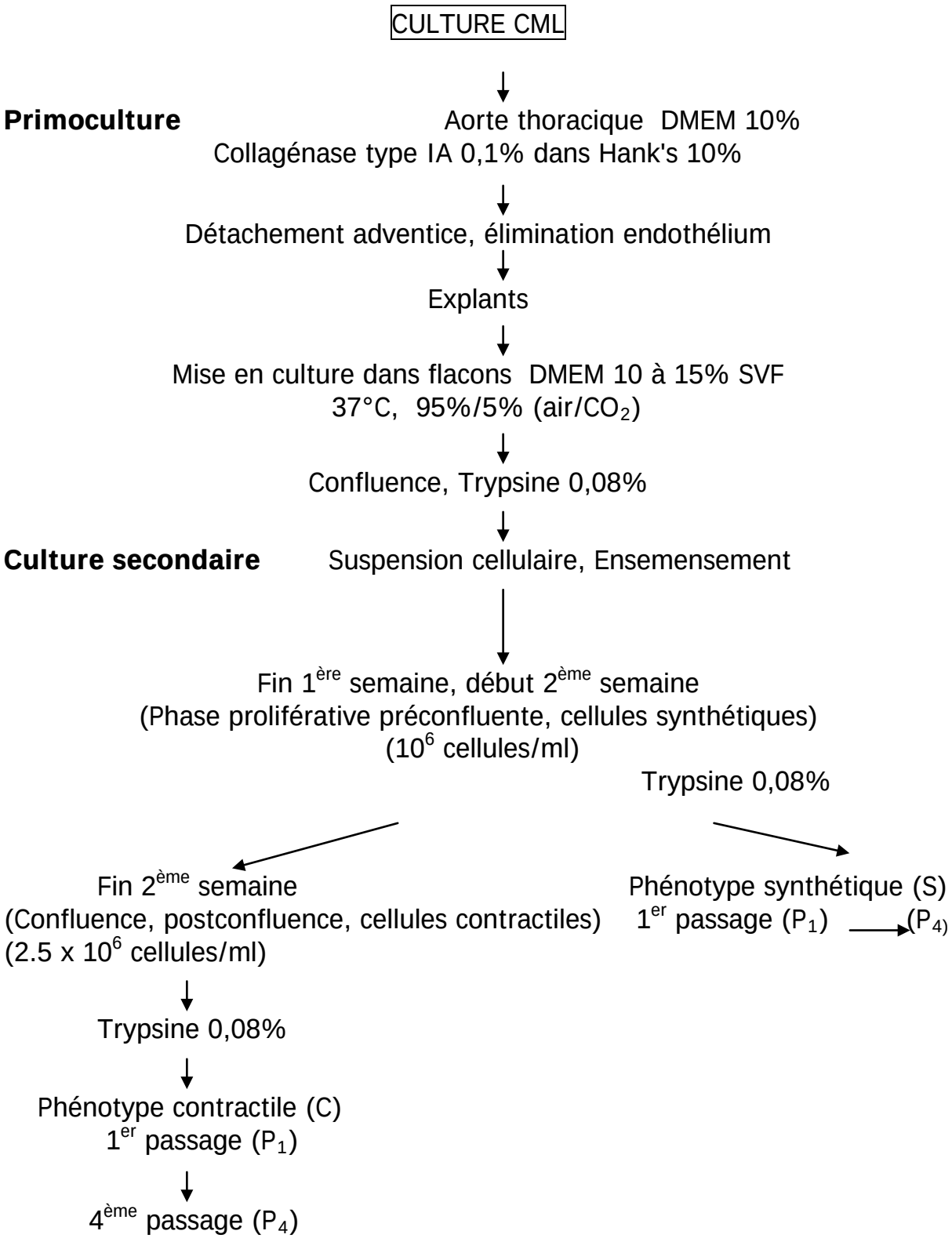


Fig. 3 - Isolement de la média après détachement de l'adventice

Fig. 4 - Explants coupés à partir de la média d'aorte de R.n: anneaux de 1 mm d'épaisseur (Ex)

Fig. 5- Explants coupés à partir de la média d'aorte de P.o : Fragments de 1 à 3 mm^2

Figure 26


CULTURE CML
Primoculture
Aorte thoracique DMEM 10%
Collagénase type IA 0,1% dans Hank's 10%
Détachement adventice, élimination endothélium
Explants
Mise en culture dans flacons DMEM 10 à 15% SVF
37°C, 95%/5% (air/CO2)
Confluence, Trypsine 0,08%
Culture secondaire
Suspension cellulaire, Ensemensement
Fin 1ère semaine, début 2ème semaine
(Phase proliférative préconfluente, cellules synthétiques)
(10^6 cellules/ml)
Trypsine 0,08%
Fin 2ème semaine
(Confluence, postconfluence, cellules contractiles)
(2.5 x 10^6 cellules/ml)
Trypsine 0,08%
Phénotype contractile (C)
1er passage (P1)
4ème passage (P4)
Phénotype synthétique (S)
1er passage (P1)
(P4)

II. ETUDE MORPHOMETRIQUE (Fig. 27)

A. PRINCIPE

L'approche morphométrique inspirée des méthodes morphométriques de Robert et al., (1986), nous a permis d'effectuer les mesures des grands axes cellulaires (LC) et nucléaires (LN) à l'aide d'un micromètre et de dénombrer les nucléoles par noyau.
Chaque paramètre est évalué sur 100 cellules choisies dans différents champs.

B. PREPARATION DES CELLULES

Après trypsinisation, les CML en suspension sont ensemencées dans des plaques à 6 puits de 4 cm de diamètre ou dans des boîtes de pétri de même diamètre. Au 4ème passage, en phase de prolifération pour les CML synthétiques (8 jours après l'ensemencement) et à post confluente pour les CML contractiles (15 jours après l'ensemencement), le milieu est éliminé et les cellules sont lavées deux fois avec une solution saline de PBS à 10%. Elles sont ensuite fixées dans du bouin aqueux pendant 30 min puis colorées pendant 5min dans une solution de May Grunwald- Giemsa (V : V, 1/1) dilué au 1/3 dans de l'eau distillée stérile. Un passage de quelques minutes dans l'éthanol permet d'éliminer l'excès de colorant.

III. ETUDE BIOCHIMIQUE

A. CHOLESTEROL (FIG. 28)

1. PRINCIPE

Les trois fractions de cholestérol (libre, total et estérifié) sont évaluées selon la méthode de Salé *et al.* (1984).

La détermination du cholestérol libre (CL), nécessite la cholestérol oxydase pour régénérer le peroxyde d'hydrogène et la peroxydase qui catalyse la réaction ; peroxyde d'hydrogène + chromogène (o-dianisidine). Une cholestérol ester hydrolase est utilisée pour déterminer le cholestérol total (CT). La fraction de cholestérol estérifié (CE) est déduite de la différence entre CT et CL.

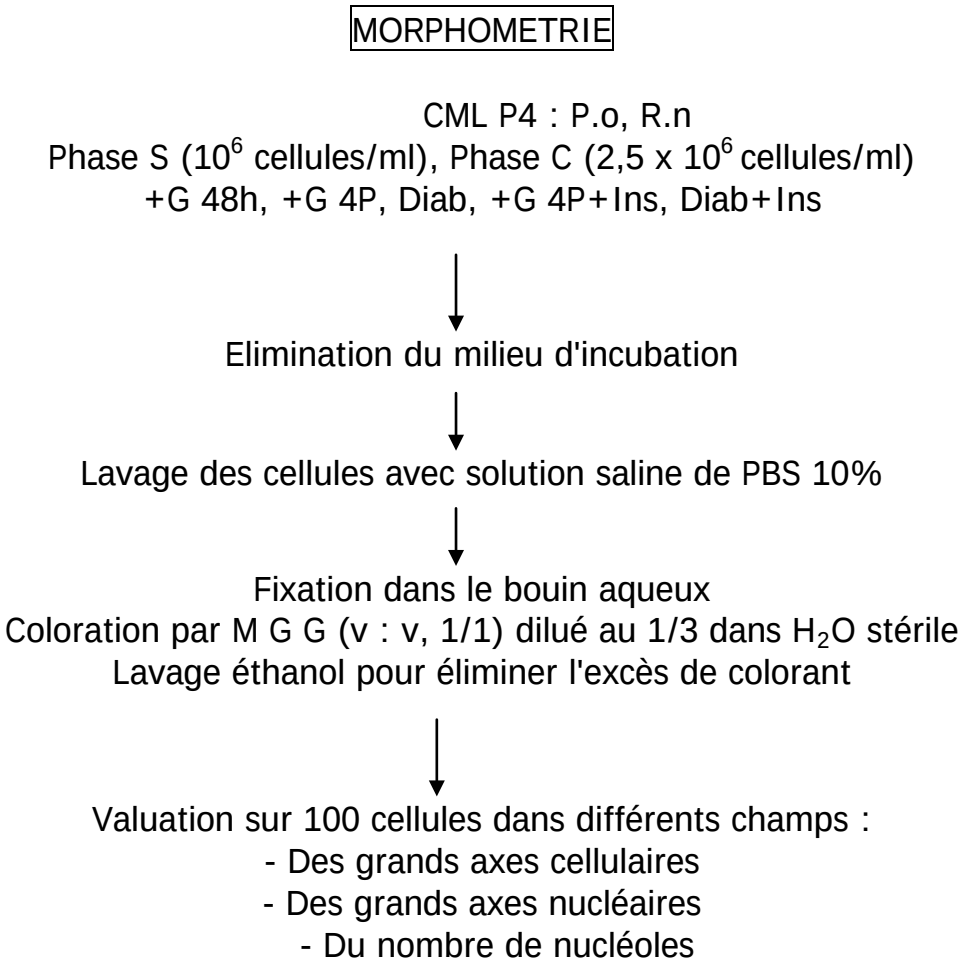
Cette méthode a l'avantage de pouvoir être appliquée aux extraits lipidiques tissulaires, sa sensibilité étant étendue à quelques µg de cholestérol.

2. REACTIFS

Les enzymes utilisés provenant de Boehringer Mannheim Corporation sont : la horseradish péroxydase (250 UI/mg), la cholestérol oxydase (45 UI/mg) et la cholestérol ester hydrolase (55 UI/mg). Les solvants et les autres réactifs sont de degré analytique et utilisés sans purification supplémentaire :

- Méthanol, chloroforme (Merck)
- Tris, O-dianisidine, triton x100 (Merck)
- Cholate de sodium, cholestérol (Sigma)

Figure 27


MORPHOMETRIE
CML P4 : P.o, R.n
Phase S (10^6 cellules/ml), Phase C (2,5 x 10^6 cellules/ml)
+G 48h, +G 4P, Diab, +G 4P+Ins, Diab+Ins
Elimination du milieu d'incubation
Lavage des cellules avec solution saline de PBS 10%
Fixation dans le bouin aqueux
Coloration par M G G (v : v, 1/1) dilué au 1/3 dans H_2O stérile
Lavage éthanol pour éliminer l'excès de colorant
Valuation sur 100 cellules dans différents champs :
- Des grands axes cellulaires
- Des grands axes nucléaires
- Du nombre de nucléoles

Composition des solutions pour le test des fractions de cholesterol libre et total

Tampon A	- Tris – HCl ; pH 6,6 ; 0,1 M - triton x 100 0,5% - Cholate de sodium 3mM
Réactif 1 (Dosage CL)	- Tampon A - Péroxydase 0,2 UI/ml - Cholestérol oxydase 0,125 UI/ml - O - dianisidine 0,1 mg/ml
Réactif 2 (Dosage CT)	- réactif 1 - Cholestérol ester hydrolase 0,125 UI/ml

3. EXTRACTION DES LIPIDES

Après trypsinisation, les cellules de chaque flacon sont reprises par 1,1ml de solution saline de Hank's à 10%. 100 µl sont prélevés pour la numération des cellules qui se fait en présence d'un colorant vital : le bleu de trypan 0,2%.

L'extraction des lipides réalisée sur 1 ml de suspension est réalisée selon la méthode de Folch (1957) par le mélange chloroforme – méthanol (2 : 1, V/V) durant une nuit à 4°c puis l'extrait subit successivement :

- une filtration sur papier filtre dégraissé
- un lavage à l'eau distillée (0,2ml x Volume total) pour éliminer les substances hydrosolubles.
- une centrifugation de 10mn à 3500 tours/minute.

La phase supérieure contenant les contaminants hydrosolubles est éliminée, la phase inférieure est récupérée puis évaporée à sec.

4. CHOLESTEROL LIBRE

Une gamme étalon de 3, 10, 15, 20, 25 et 30 µg est préparée à partir d'une solution mère de cholestérol à 1 mg/ml d'éthanol.

Pour une évaporation plus complète, nécessaire pour éliminer toute interférence avec l'eau, les tubes sont chauffés pendant 30 min à 95°C. De l'éthanol anhydre (200 µl par échantillon) est ajouté pour remettre en suspension les extraits secs.

La réaction se fait en présence du réactif (1) préparé extemporanément (800 µl par échantillon). Après agitation, les tubes sont incubés 5 minutes à 37°C ; l'absorbance est mesurée à 450 nm contre un réactif blanc.

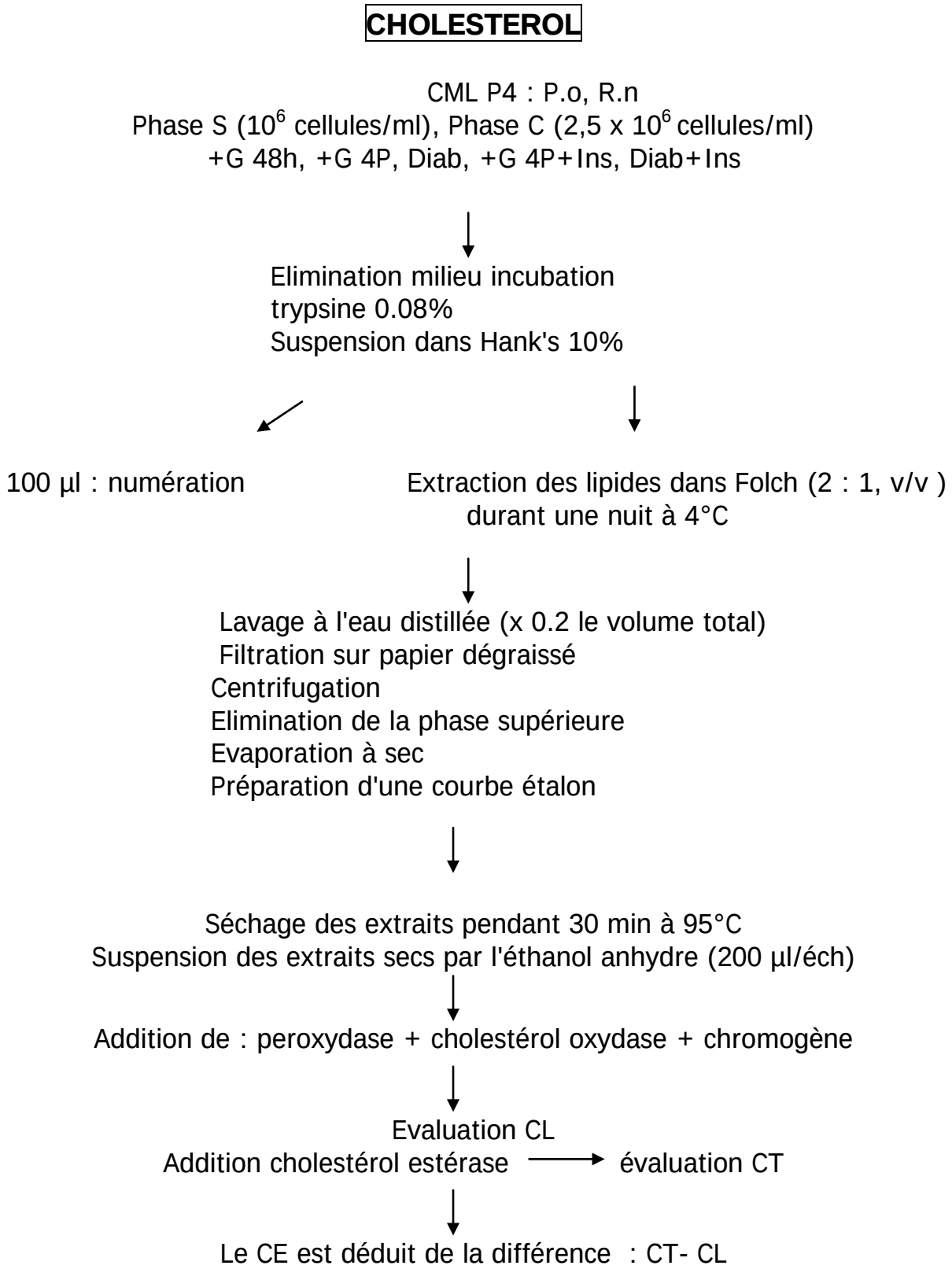
5. CHOLESTEROL TOTAL

Aux standards et échantillons sont ajoutés 10 µL de cholestérol estérase. Après agitation et incubation des tubes pendant 40 min à 37°C, l'absorbance est mesurée à 450 nm.

6. CHOLESTEROL ESTERIFIE

L'estimation du cholestérol estérifié est déduite de la différence (CT – CL).

Figure 28


CHOLESTEROL
CML P4 : P.o, R.n
Phase S (10^6 cellules/ml), Phase C (2,5 x 10^6 cellules/ml)
+G 48h, +G 4P, Diab, +G 4P+Ins, Diab+Ins
Elimination milieu incubation
trypsine 0.08%
Suspension dans Hank's 10%
100 µl : numération
Extraction des lipides dans Folch (2 : 1, v/v)
durant une nuit à 4°C
Lavage à l'eau distillée (x 0.2 le volume total)
Filtration sur papier dégraissé
Centrifugation
Elimination de la phase supérieure
Evaporation à sec
Préparation d'une courbe étalon
Séchage des extraits pendant 30 min à 95°C
Suspension des extraits secs par l'éthanol anhydre (200 µl/éch)
Addition de : peroxydase + cholestérol oxydase + chromogène
Evaluation CL
Addition cholestérol estérase
évaluation CT
Le CE est déduit de la différence : CT- CL

B. QUANTIFICATION DES PROTEINES ET DES COLLAGENES TOTAUX

La fraction des protéines totales et la fraction collagénique pepsino-résistante sont dosées par la méthode de Bradford (1976).

1. PRINCIPE

Il est basé sur la coloration des protéines par le bleu de Coomassie G 250. La liaison du colorant aux protéines détermine un maximum d'absorption à 595 nm. La coloration est stable durant 1h et la présence de cations tels les ions sodium et potassium n'interfère pas avec la coloration des protéines.

2. REACTIFS

2.1. Réactif de Bradford

Le bleu de Coomassie (0,01%) est dissout dans 4,7% d'éthanol à 95° ; 8,5% d'acide orthophosphorique à 85% sont ajoutés au mélange ainsi obtenu qui est filtré puis conservé à l'obscurité pendant un mois à 4°C.

2.2. Gamme étalon

La concentration de la solution mère de BSA (nutritionnal Biochemicals Corporation) à 0,1 mg/ml est mesurée par spectrophotométrie à 280 nm. Sachant que l'épsilon molaire de la BSA est de 6,6, la concentration réelle est vérifiée par le rapport : densité optique / Epsilon.

Une gamme étalon de 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 ; 7 ; 5 et 10 µg est préparée à partir de la solution mère.

Toutes les dilutions des solutions protéiques sont effectuées en présence de chlorure de sodium 0,15 M.

3. Dosage des protéines

Echantillons et standards sont ajustés à un volume final de 100 µl. Après addition de 2 ml de réactif de Bradford et agitation, l'absorbance est mesurée à 595 nm contre un blanc. La concentration en protéines de la solution analysée est obtenue par extrapolation.

IV. ETUDE DE LA BIOSYNTHESE DES PROTEINES ET DES COLLAGENES TOTAUX (Fig. 29)

L'incorporation de la proline tritiée (2–5^{3}H Pro ; Isotopchim) permet l'estimation du taux de collagène total selon la méthode de Peterkofsky (1982) modifiée par Okada *et al.*, (1990).

A. PREPARATION DES CML

Les CML à leur état synthétique et contractile sont incubées pendant 24h dans un milieu dépourvu de SVF, additionné d'acide ascorbique (50 µg/ml) et de proline tritiée à 10 µCi/mL dont l'activité spécifique correspond à 20 Ci/mmol.

B. DETERMINATION DE LA RADIOACTIVITE TOTALE DES PROTEINES ET DES COLLAGENES

Les différents milieux d'incubation correspondant aux compartiments extracellulaires ou CEC (1,5ml par échantillon) sont récupérés et évalués dans des tubes stériles gradués. Les couches cellulaires correspondant aux compartiments intracellulaires ou CIC sont grattées à l'aide de pipettes Pasteur, confectionnées sur place à la flamme, puis récupérées chacune dans 1,1ml de milieu (DMEM à 10% de SVF).

Toutes les fractions sont récupérées dans des sacs de dialyses traités (Serva, 8/32) comme suit :

- les sacs sont bouillis 10mn dans une solution EDTA 0,1 M.
- Ils sont lavés 3 fois (1h de lavage) dans de l'éthanol 50°
- Ils subissent deux autres lavages dans une solution de bicarbonate de sodium 10 mM + EDTA 1mM
- un dernier lavage se fait dans de l'eau distillée
- les sacs sont conservés à 4°C dans de l'éthanol 50°

Une fois remplis et fermés hermétiquement les sacs subissent deux dialyses successives de 24h, à 4°C, sous agitation douce. La première est réalisée contre l'eau courante, la deuxième contre l'acide acétique 0,5 M.

Après dialyse, le volume total recueilli est évalué ; deux aliquots de 100 µl sont prélevés pour déterminer la radioactivité des protéines totales et leur quantification par la méthode de Bradford (1976). Les échantillons remis dans d'autres sacs sont soumis à une troisième dialyse en présence de pepsine (Merck) à 200 µg/ml durant 24h à 4°C. Le volume total est mesuré et la radioactivité pepsino-résistante correspondant aux collagènes totaux est alors déterminée par comptage sur 100 µl.

Le comptage de la radioactivité contenue dans les échantillons avant et après pepsination est réalisé en scintillation liquide sur compteur β après addition de liquide scintillant (PPO, 0.4 % ; POPOP, 0.01 % dissouts dans le toluène).

Deux autres aliquots sont prélevés :

- 100 µl pour le dosage des collagènes totaux par la méthode de Bradford.
- 500 µl sont congelés puis lyophilisés pour le typage des collagènes par électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE.

C. EXPRESSION DES RESULTATS

L'incorporation de la proline tritiée, exprimée en cpm/10^6 cellules, a permis la détermination de :

- L'incorporation de la proline tritiée dans les protéines extracellulaires : nombre de cpm dans le milieu avant pepsination (1)
- La biosynthèse des protéines intracellulaires : nombre de cpm dans les cellules avant pepsination (2)
- La biosynthèse des protéines totales : (1) + (2)
- La biosynthèse du collagène total : nombre de cpm dans le milieu après pepsination + nombre de cpm dans les cellules
- La proportion d'excrétion des protéines totales et du collagène selon le rapport : Nombre de cpm milieu / biosynthèse totale contenue dans le milieu et les cellules.
- Le taux de collagène total selon le rapport biosynthèse totale après pepsination / biosynthèse totale avant pepsination (Wiestner *et al.*, 1982).

V. TYPAGE DES COLLAGENES

A. PRINCIPE

Cette technique est basée sur l'évaluation de l'incorporation de la proline tritiée dans les différentes chaînes α des collagènes I et III. Ces dernières sont séparées par électrophorèse verticale sur gel de polyacylamide à 10% de SDS dans les conditions dénaturantes par le β mercaptoéthanol à 100°C (Laemmli, 1970).

B. PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons de collagène extra et intracellulaires, recueillis après la 3ème dialyse, sont lyophilisés puis repris par un tampon d'incubation (200 µl par échantillon) constitué de :

- Tris HCl 0,5 M ; pH 6,8
- SDS (sulfate dodecyl sodium) 14%
- Bleu de bromophénol 0,05%
- Glycérol 0,5%
- EDTA 2mM
- β mercaptoéthanol 0,25%

Ce dernier provoque, par rupture des ponts disulfures la séparation des chaînes α des collagènes dans les conditions dénaturantes (incubation 3 à 5 minutes à 100°C).

C. PREPARATION DES GELS

La migration des protéines est réalisée sur un gel de séparation à 10% surmonté d'un gel de concentration à 7,5%.

Constituants des gels	Gel de concentration (ml)	Gel de séparation (ml)
Solution acrylamide acrylamide 22% méthylènebysacrylamide 0,6%	1,35	16,2
Eau distillée	3,5	4
Lower buffer : tris 1,5 M ; pH 8,8	-	9
Upper buffer : tris 0,5M ; pH 6,8	2,5	-
Saccharose 55% Dégazage de quelques min	2,5	6
SDS 10%	0,1	0,36
Persulfate d'ammonium 10% préparé extemporanément	0,1	0,36
Temed : agent de polymérisation	0,01	0,036

Dans le gel de concentration, des puits sont organisés à l'aide d'un peigne ; l'injection des différentes solutions de protéines se fait à l'aide d'une seringue Hamilton de 50 µl. Pour établir la courbe étalon, un puits est réservé au marqueur des poids moléculaires constitué de protéines dont le poids moléculaire varie entre 12,5 kD et 94 kD.

Marqueurs de PM	Volume (µl)	PM (kD)
Phosphorylase 1mg/ml	5	94
Sérum albumine bovine 1mg/ml	20	68
Phosphocréatine kinase 1mg/ml	20	40
Soja bean trypsin inhibitor 0,5mg/ml	60	21,5
Cytrochrome C 2mg/ml	20	12,5
Eau distillée	200	
Tampon d'incubation	325	

D. CONDITIONS D'ELECTROPHORESE

L'électrophorèse est réalisée sur système Hoefeer durant une nuit (over night).

Conditions	Gel concentration	Gel séparation
Courant moyen (A)	150	15
Voltage moyen (V)	400	50
Puissance (W)	19	3
Temps de migration	60mn	20h

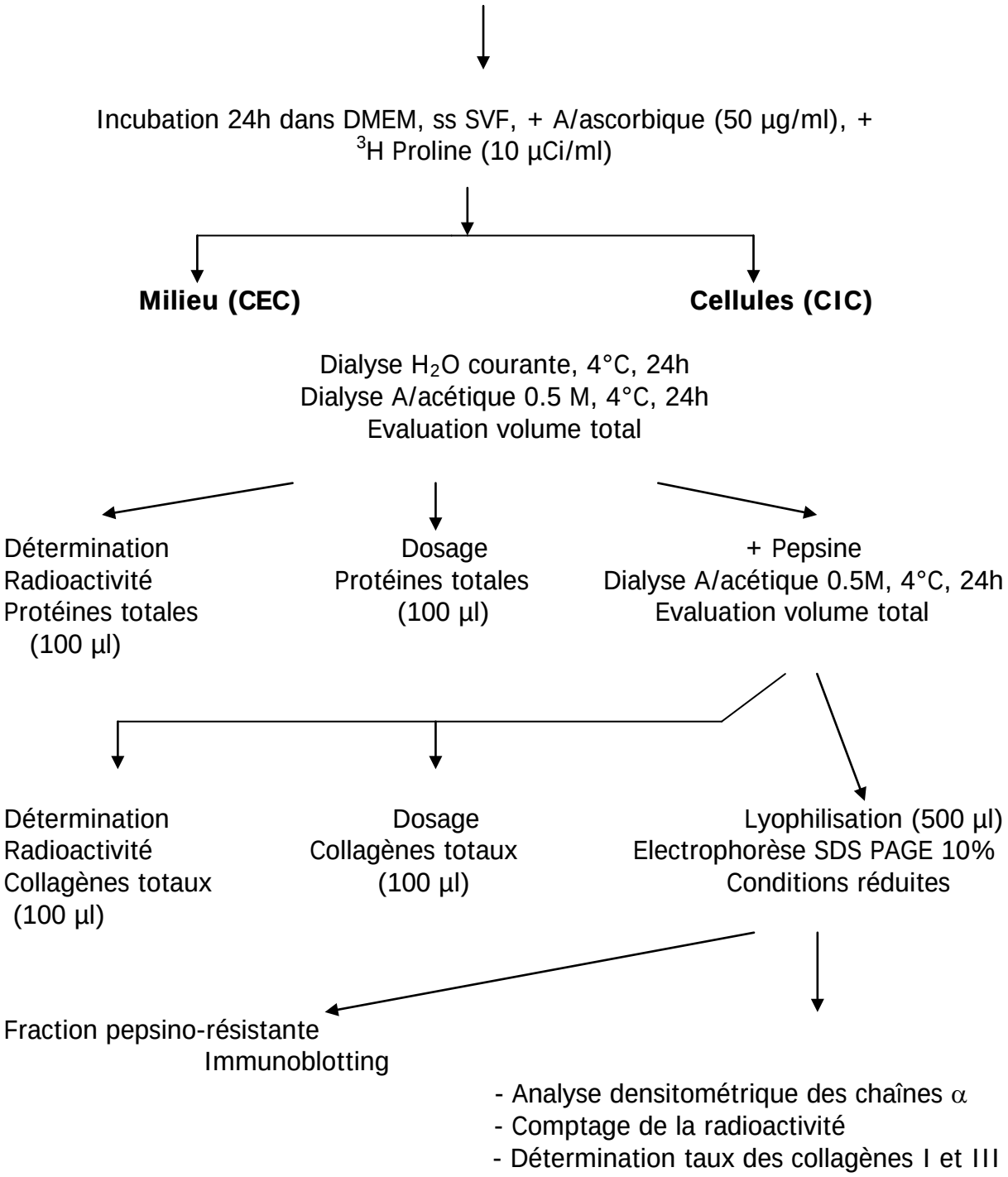
E. DETERMINATION DE LA RADIOACTIVITE DES CHAINES α1 ET α2 DES COLLAGENES I ET III

Après électrophorèse, les chaînes α1 (I + III) et α2 (I) séparées sont colorées par le mélange : bleu de Coomassie G 250 (0,025%), propanol 2 (25%), acide acétique (10%).

Les gels sont ensuite décolorés dans une solution d'acide acétique à 10% ; les bandes obtenues correspondant aux chaînes α1 et α2 (Fig. 26) sont intégrées sur densitomètre. les aires obtenues sont évaluées selon la formule de Simpson et les taux de synthèse des chaînes α1 et α2 sont déterminés par intégration numérique.

Figure 29

BIOSYNTHESE DES COLLAGENES



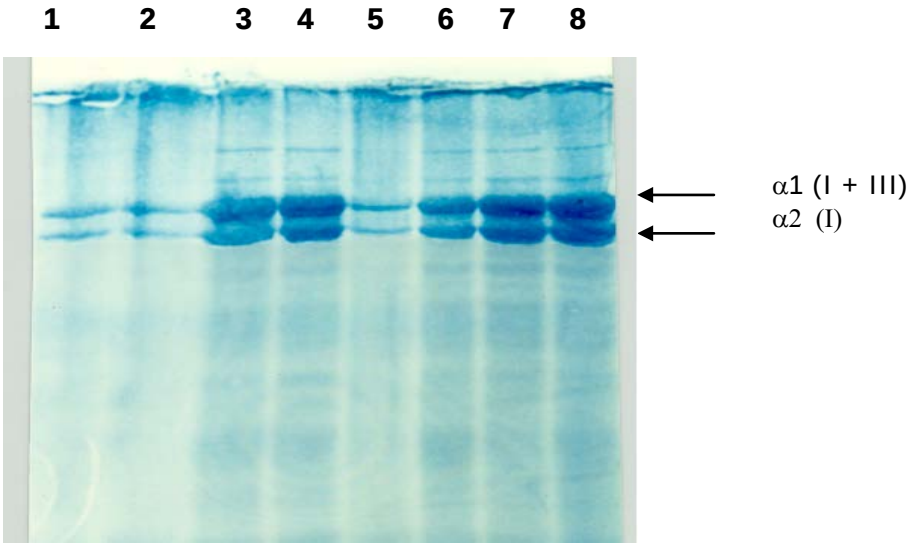


Figure 30 - Séparation des différentes chaînes α des collagènes I et III.
Migration sur SDS PAGE sur gel de polyacrylamide à 10% dans les conditions dénaturantes des chaînes α1 et α2 des collagènes I et III (compartiment extracellulaires et intracellulaires des CML de P.o dans les différentes conditions expérimentales.
5 : témoin synthétique ; 1 : + G 48h dans le CEC ; 2 : + G 48h dans le CIC ; 3 : + G 4P dans le CEC ; 4 : + G 4P dans le CIC ; 7 : Diab dans le CIC ; 8 : Diab dans le CEC ; 6 : +Ins dans le CEC.

Les gels sont ensuite séchés sous vide 3h à 80°C, les chaînes α1 et α2 (Fig. 30) sont découpées et leur radioactivité est éluée dans du peroxyde d'hydrogène à 12% pendant une nuit à 50°c. Le comptage est réalisé en scintillation liquide et la radioactivité est estimée en cpm/10^6 cellules.

VI. PROCEDE IMMUNOLOGIQUE (FIG. 35)

Cette étude a été effectuée en 3 périodes principales.
- Immunisation de lapin et de bouc pour les productions respectives d'anticorps anti collagène I et anti collagène III.
- Evaluation du titre des Anticorps par ring test et électrosynérèse
- Electro-transfert pour la détermination des sites antigéniques des chaînes α des collagènes I et III

A. IMMUNISATION

Les antigènes (collagène I et III, SIGMA) préparés respectivement à 2 et 3 mg/ml, sont dissous dans 0,1% de collagénase à 37°C sous agitation continue.

L'injection primo-immunisante bien homogénéisée contient 1 ml d'antigène et 1ml d'adjuvant complet de Freund (ACF). Elle est précédée de la première saignée (So) dans la jugulaire pour le bouc et dans les veines de l'oreille interne pour le lapin. Des injections de rappel sont faites tous les 10 jours dans les mêmes conditions que la primo-injection.

Une saignée précède chaque rappel dont l'immunogène est préparé en présence d'adjuvant incomplet de Freund (AIF).

B. PRECIPITATION EN MILIEU LIQUIDE OU RING TEST

Le principe est basé sur la technique de Heidelberger qui consiste à faire réagir des quantités croissantes d'antigènes avec une quantité fixe d'anticorps. De cette façon, il apparaît un précipité de complexes Ag-Ac dans certains tubes. Ainsi fut décrite la courbe de précipitation en milieu liquide (Fig. 31). Celle-ci montre que la quantité de précipité varie en fonction de la quantité d'Ag ; plus précisément cette quantité de précipité augmente, passe par un maximum puis diminue. La 1ère partie de la courbe (1) correspond à la présence d'Ac libre, c'est la zone d'excès d'Ac. La dernière partie de la courbe (3) est représentée par la zone d'excès d'Ag. La zone du milieu est la zone d'équivalence ; elle correspond au maximum de liaison Ag-Ac.

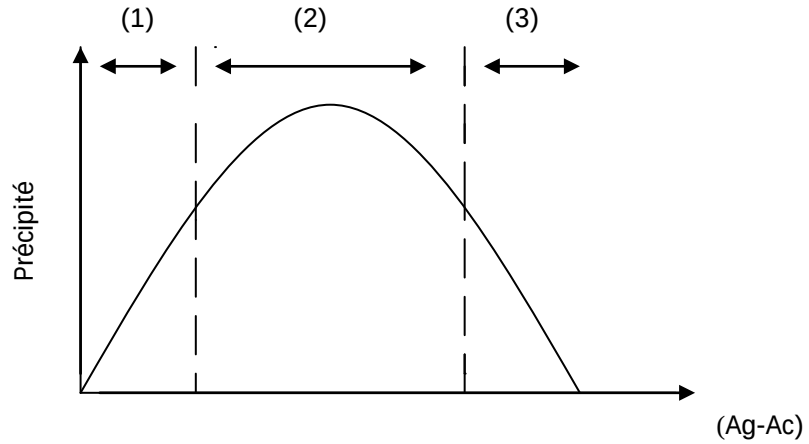


Figure 31 - Zone d'équivalence indiquée par la Courbe de

Des dilutions de l'immunsérum sont effectuées dans l'ordre décroissant de 1/2 à 1/160. Le ring test est réalisé à l'aide de capillaires. Pour chaque dilution, 20 µl d'Ag puis 20 µl de sérum sont récupérés dans un capillaire.

Si le test est négatif, les injections rappels se poursuivent jusqu'à visualisation d'un précipité blanchâtre indicatif de la zone d'équivalence. Chez le bouc, la 1ère zone d'équivalence apparaît au 40ème jour entre les dilutions 1/6 et 1/8 (Fig. 32). Chez le lapin, la réaction devient positive au 60ème jour entre 1/2 et 1/6 (Fig. 32).

Les rappels se sont poursuivis jusqu'à l'obtention d'un maximum d'Ac et qui correspondent au 90ème jour pour les Ac anti-collagène III chez le bouc et au 110ème jour pour les Ac anti-collagène I chez le lapin.

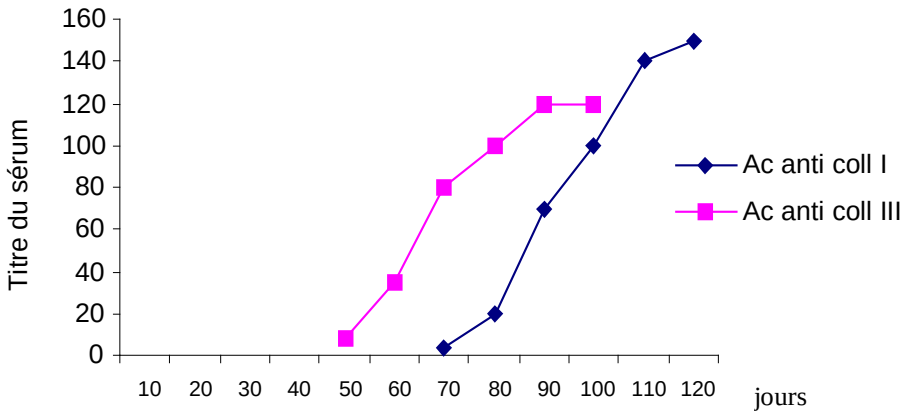


Figure 32 - Détermination de la zone d'équivalence par précipitation en milieu liquide (ring test) des anticorps anti collagène I et anti collagène III.
Le maximum d'anticorps anti collagène I est obtenu le 110ème jour (11ème rappel).
Le maximum d'anticorps anti collagène III est obtenu le 90ème jour (9ème rappel).

C. ELECTROSYNERESE

1. PRINCIPE

C'est la précipitation basée sur le fait qu'un Ag et un Ac peuvent diffuser dans un gel semi-solide constitué par de l'agar ou un équivalent.

Cette méthode d'immunodiffusion double décrite par Ouchterlony (1958) permet l'immunoprécipitation sur gel d'agar noble. Un précipité se forme lorsque les gradients de concentration d'Ac et d'Ag font qu'ils se trouvent dans la zone d'équivalence. L'immunodiffusion qualitative peut être orientée sous l'effet d'un champ électrique et correspondre à la contre immunoélectrophorèse ou électrosynérèse (inspirée de l'immunoélectrophorèse decrite par Grabar en 1958 et qui associe l'électrophorèse à la double diffusion). L'électrosynérèse est accélérée à pH neutre ou légèrement alcalin, à courant et voltage bas. Après la migration des Ag vers l'anode et celle des Ac vers la cathode, un arc de précipitation apparaît correspondant à la zone d'équivalence.

2. PROCEDE

2.1. Préparation du gel de migration

1,5 g d'Agar noble dissous dans 100ml d'eau distillée sont portés à ébullition jusqu'à obtention d'une solution transparente. Le gel est coulé sur des lames en verre préalablement nettoyées et séchées (4ml par lame).

2.2. Polymérisation du gel et confection des puits

La polymérisation se fait à température ambiante mais pour donner plus de fermeté au gel, les lames sont placées à 4°c pendant au moins 30mn. Des puits sont alors creusés grâce à un système aspirant relié à une pompe à vide.

2.3. Conditions de migration

La migration, d'une durée de 2h à courant et voltage bas (25 Ampères et 150 Volts), est effectuée dans un tampon constitué de 0,007% de lactate de calcium, 0,138% de véronal acide et 0,896% de véronal sodique.

2.4. Coloration

Les lames sont lavées 3 fois durant 15min dans du NaCl à 0,9%, recouvertes de papier Wathman, mises à sécher à 50°c pendant une nuit puis colorées.

Le colorant est constitué de 6% de bleu de Coomassie G250, 40% de méthanol, 10% d'acide acétique et 50% d'eau distillée.

La décoloration des lames se fait dans le mélange méthanol (40%), acide acétique (10%), eau distillée (50%).

D. IMMUNOBLOTTING

C'est une méthode sensible utilisée au cours d'une analyse immunologique ou biochimique car elle permet de détecter et de caractériser efficacement une molécule dans un extrait brut (Towbin *et al.*, 1979).

١. *PROTOCOLE EXPERIMENTAL*

1.1 Electrophorèse

Les chaînes α1 et α2 des collagènes I et III contenues dans les extraits des compartiments extra et intracellulaires sont séparées par électrophorèse sur le gel de polyacrylamide (10% de réticulation) en milieu dénaturant (10% de SDS) et dans des conditions réduites.

1.2 Transfert (Fig. 33)

Ce dernier est réalisé sur une feuille de nitrocellulose ayant des pores de 0,45 µm de diamètre. Ce type de matrice est utilisé pour des protéines de PM > 20kD dont le collagène (> 96kD).

La feuille de nitrocellulose imbibée du tampon de migration est placée sur le gel puis prise en sandwich entre deux plaques support.

Le transfert est réalisé en tampon tris (0,189%), glycine (0,912%) et méthanol (20%) à pH 8,6. Les conditions de transfert se font sous agitation douce à 4°C pendant 4h, à voltage bas (1 Ampère), dans une cuve préalablement réfrigérée.

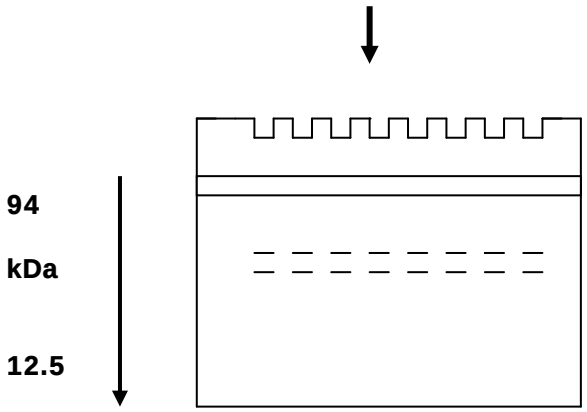
L'électroélution est la méthode de transfert la plus employée pour les protéines. La matrice à pH basique chargée négativement est placée du côté anode. Les protéines en gel SDS se comportent comme des anions, migrent du gel vers la matrice. Ce sont donc des interactions hydrophobes qui semblent jouer un rôle prépondérant lors de la fixation.

1.3. Détection et détermination des poids moléculaires

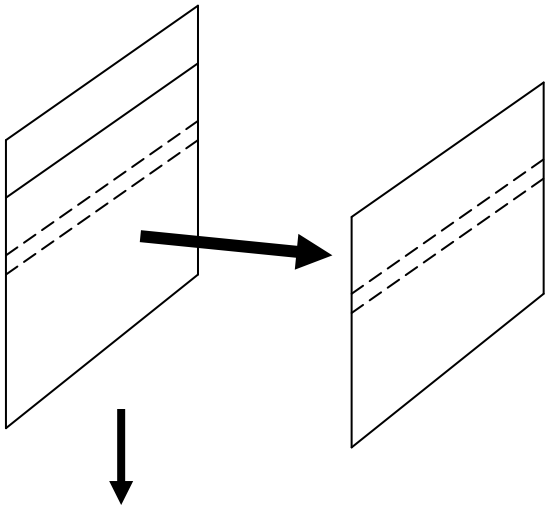
Afin d'apprécier directement l'efficacité du transfert, nous procédons à deux opérations :

Figure 33

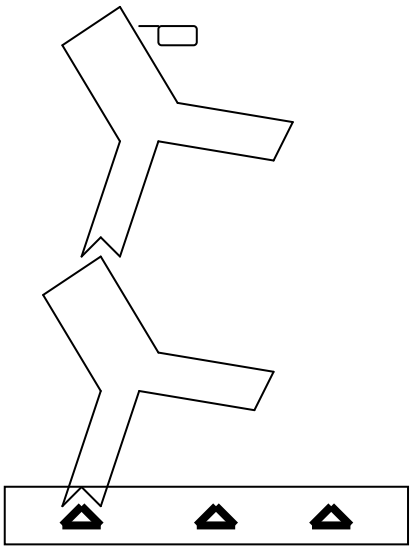
CMLs 4P, R.n et P.o (N, N+G 48h, N+G 4P, D, +I) + milieux correspondants



Electrophorèse verticale sur gel de polyacrylamide 10%



Immunoblotting : Transfert des chaînes α des collagène I ou III sur nitrocellulose.



$2^{ème}$ Ac couplé à la péroxydase spécifique anti Ig de bouc ou de lapin permettant l'immunorévélation

1^{er} Ac (immunsérum de bouc ou de lapin) anticollagène I ou III

Chaînes α transférées sur nitrocelluose (Ag)

- la visualisation d'un témoin de transfert (un slott des marqueurs de PM et un slott d'extrait) qui est découpé de la matrice puis coloré au noir amide. La décoloration est effectuée dans le mélange méthanol (80%), acide acétique (20%) (Fig. 34).

- la coloration du gel au bleu de Coomassie (l'intensité de la couleur des bandes est atténuée)

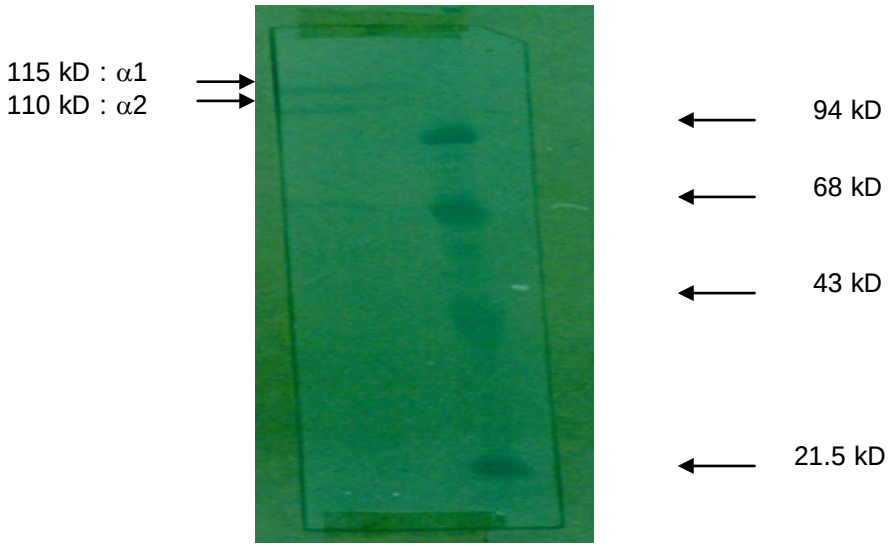


Figure 34 - Témoin de transfert. La coloration au noir amide d'un fragment de la matrice met en évidence les marqueurs de PM et les chaînes α1 (I) et α2 (I) du collagène I de la fraction du CEC de P.o normal. Les poids moléculaires sont extrapolés d'une courbe standard établie sur papier semi-logarithmique

1.4. Marquage spécifique

Avant de procéder au marquage, les sites de fixation non spécifiques sont saturés après incubation de la matrice dans des agents bloquants qui sont :

- le PBS-tween 0,05% (3 fois durant 15min)
- le PBS- Hb 3% (30min)

La matrice est alors coupée en bandelettes correspondant au nombre de slotts déposés. Pour localiser et caractériser les chaînes α1 et α2, les bandelettes sont incubées, en présence d'un premier Ac dilué à 4%, pendant une nuit à 4°C, sous agitation douce.

Pour cette étude deux Ac sont utilisés : les Ac anti-collagène I contenus dans l'immun sérum de lapin et les Ac anti-collagène III contenus dans l'immun sérum de bouc.

L'Ac s'hybride avec une haute affinité sur les protéines cibles. Après 3 lavages successifs de 10min dans du PBS-tween 0,05%, les bandelettes sont incubées 1 à 2 heures à température ambiante dans du PBS-Hb 3% en présence d'un 2ème Ac greffé au système de révélation qui est la péroxydase.

Les deux autoanticorps utilisés sont:

- l'anti-Ig de bouc (Dako) dilué au 1/2000 pour l'Ac anti- collagène III.
- L'anti-Ig de lapin (Sanofy) dilué à 1/250 pour l'Ac anti-collagène I.

L'hybridation terminée, les bandelettes sont lavées au PBS-tween 0,05% afin d'éliminer le ligand fixé non spécifiquement ou libre.

Figure 35

PROCEDE IMMUNOLOGIQUE

IMMUNISATION

Production d'anticorps anti collagène I et anti collagène III :
- Saignée (So)
- primo injection de l'antigène + ACF
  - collagène I à 1 mg/ml ⟶ lapin
  - collagène III à 2 mg/ml ⟶ bouc
- rappel : Ag + AIF (tous les 10 j)

DETERMINATION DES ANTICORPS

- Précipitation en milieu liquide (Ring Test)
- Immunodiffusion sur gel d'agar (Electrosynérèse)

IMMUNOBLOTTING

CMLs et c P4 : P.o, R.n,
phase de prolifération (S), post confluence (C)
+ G 48h, + G 4P, Diab, + G 4P +Ins, Diab + Ins

Milieu (CEC) Cellules (CIC)

- Electrophorèse SDS PAGE 10%
- Séparation des chaînes α1 (I + III) et α2 (II)
- Transfert sur feuille de nitrocellulose 0.45 µm de diamètre dans tampon à pH 8.6
- Conditions de transfert : 4°C, 4H, 1 A, agitation douce
- Marquage spécifique :
  - Saturation des sites non spécifiques
  - Incubation en présence de l'Ac spécifique (anti coll I ou III) : hybridation Ac-protéines spécifiques
  - Incubation en présence d'un 2ème Ac greffé à la péroxydase (Anti Ig de bouc, Anti Ig de lapin)
- Révélation des sites antigéniques sur les chaînes α

1.5. Révélation

Elle est effectuée en présence du 3-3 DAB tétrachloride 0,5% dissout extemporanément dans une solution de Tris-HCl 50mM, pH 7,6. 3% d'hydroxyde d'oxygène sont ajoutés en dernier à la solution de révélation.

L'arrêt de la réaction se fait par un lavage des bandelettes à l'eau distillée après 15min d'incubation.

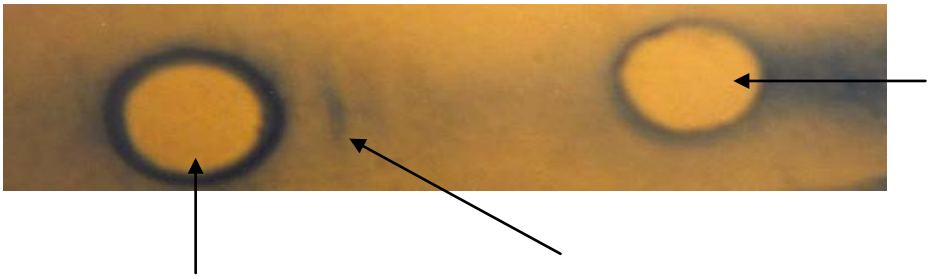
E. ABSORBANCE

Elle consiste à isoler un Ac contenu dans un immun sérum donné. Afin de mieux apprécier la spécificité de l'anticorps anti collagène I, nous avons, par absorbance, procédé à la séparation des Ac anti α2 et des Ac anti α1 contenus dans l'immunsérum de lapin (et correspondant à l'Ac anti collagène I) selon le procédé suivant:

5ml d'immun sérum de lapin (contenant Ac anti α1 et Ac anti α2) sont mis dans des tubes coniques en présence de 5 à 10 mg de collagène III qui ne contient que des chaînes α1 (utilisé comme Ag) puis soumis à une rotation de 24 à 48 h à 4°C.

Une 2ème rotation est effectuée en présence d'un nouvel Ag (collagène III) pour fixer tous les Ac anti α1 contenus dans l'immun sérum.

L'absorbance terminée, l'immun sérum est testé par électrosynérèse ; un seul arc de précipitation apparaît correspondant à l'anticorps anti α2 (Fig. 36)



Ac anti collagène I après absorbance Arc de précipitation montrant l'Ac anti α2

Figure 36 - Visualisation de l'anticorps anti α2 après absorbance

VII. EFFETS DU GLUCOSE A CONCENTRATIONS ELEVEES SUR LES CML EN CULTURE

En phase de prolifération et à confluence, les CML de R.n et de P.o normaux sont incubées dans un milieu enrichi en concentrations élevées de glucose (15 mM équivalents à 3 g/l : concentration extra physiologique rappelant un état diabétique) durant 48h et 4P. Ceci nous a permis d'étudier les effets du glucose après ces deux périodes sur la morphométrie des cellules, l'activité du cholestérol et la production des collagènes I et III.

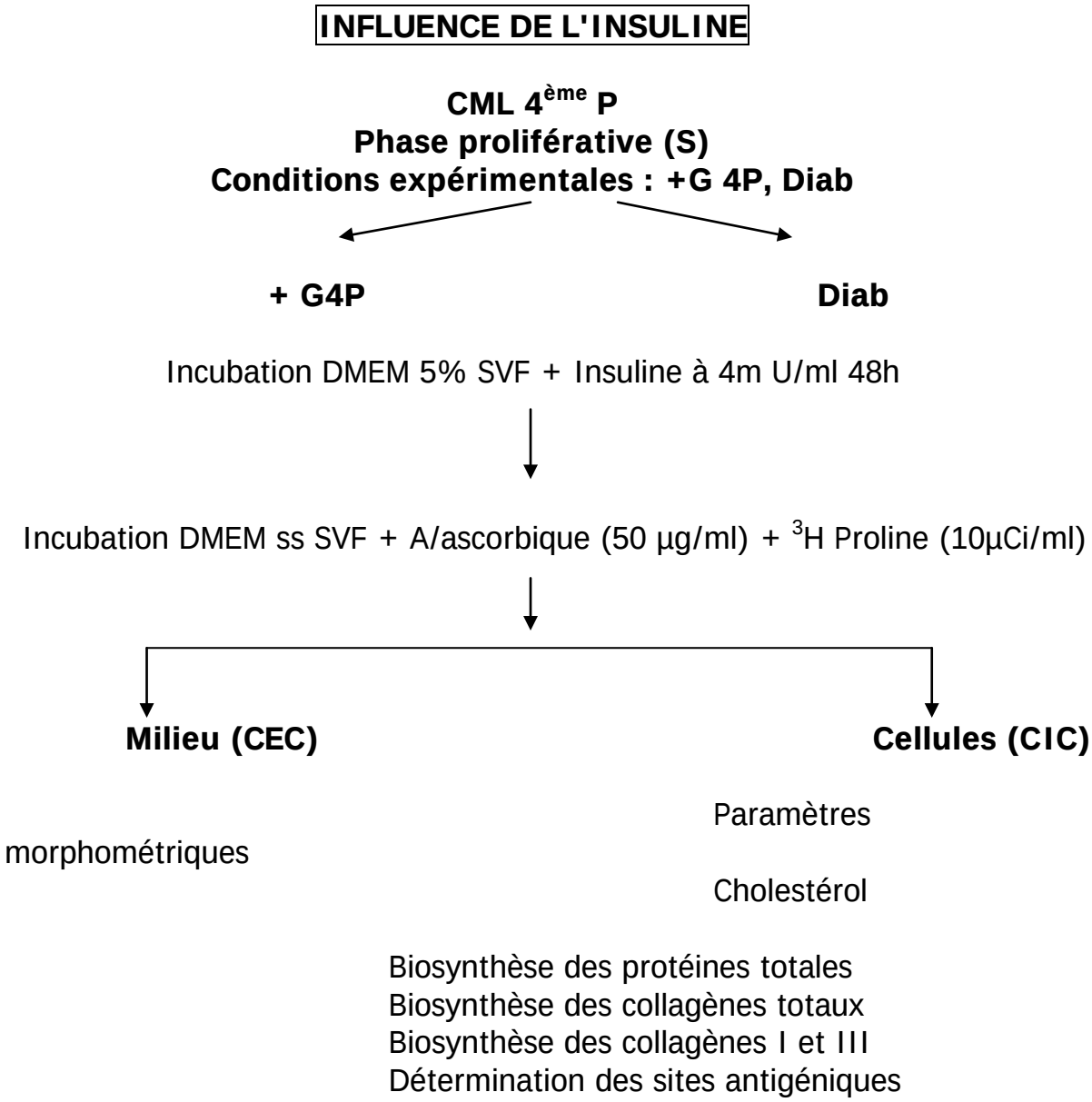
VIII. INFLUENCE DE L'INSULINE (Fig. 37)

Nous avons additionné de l'insuline humaine à faible dose (4mU/ml) durant 48h au milieu d'incubation des CMLs de R.n et de P.o incubées pendant 4P dans un milieu

enrichi en glucose, des CMLs de R.n DID et des CMLs de P.o DNID. L'étude effectuée a porté sur l'influence de l'insuline sur la taille des cellules, l'activité cholestérogénique, la

modulation des synthèses des collagènes I et III ainsi que la détermination de leurs sites antigéniques.

Figure 37



IX. ANALYSE STATISTIQUE

Dans l'étude morphométrique, biochimique et celle des biosynthèses réalisées, les valeurs présentées sont exprimées par des moyennes affectées de l'écart type à la moyenne.

Nous avons effectué une analyse statistique de comparaison des moyennes selon le test de Student.

La différence entre deux moyennes est :

- non significative si $p > 0.05$
- peu significative si $p < 0.05$
- significative si $p < 0.01$
- très significative si $p < 0.001$
- très hautement significative si $p < 0.0001$

RESULTATS

CHAPITRE I :

EVOLUTION DES CML AORTIQUES EN CULTURE ET ANALYSE MORPHOMETRIQUE

EVOLUTION DES CML AORTIQUES EN CULTURE

Dans cette partie des résultats, nous avons entrepris dans un premier temps une étude sur la prolifération des CML de R.n et P.o normaux en culture primaire et secondaire. Cette étude a été effectuée à un passage précoce afin d'éviter les interférences dues aux effets du vieillissement.

Le deuxième volet de cette étude a porté sur une approche morphométrique pour observer les effets d'une forte concentration de glucose à court et long terme, l'impact du diabète et l'influence de l'insuline sur les grands axes cellulaires, ceux des noyaux ainsi que le nombre des nucléoles.

I. PROLIFERATION DES CML EN CULTURE PRIMAIRE

La prolifération des CML en culture primaire est observée à partir d'explants d'aorte thoracique de R.n et P.o normaux ; elle correspond à l'étape comprise entre la mise en culture des explants et la confluence des cellules. L'aire de prolifération est estimée à partir de l'explant par extrapolation sur papier millimétrique.

Les explants d'aorte se fixent au support 4 à 5 jours après leur mise en culture. La migration des CML qui constituent des foyers de part et d'autre de l'explant et le début de la prolifération s'observent à la fin de la première semaine (Pl. II ; Fig. 1, 2).

Durant la 1ère et la 2ème semaine, les CML sont contractiles. Elles ont un aspect fusiforme, présentent de nombreux prolongements cytoplasmiques et un noyau central dont le grand axe coincide avec celui de la cellule (Pl. II ; Fig. 3, 4).

Au-delà du 15ème jour de la mise en culture, les cellules provenant de chaque explant occupent, par prolifération, des plages de plus en plus importantes . Elles évoluent de façon comparable pour les deux espèces étudiées (Tab. IV en annexe). Les aires de prolifération des CML de R.n et de P.o sont en moyenne respectivement égales à 106 ± 31 et 123 ± 37 mm^2 au début de la 2ème semaine ($p < 0,02$) ; à 201 ± 45 et 264 ± 48 mm^2 au cours de la 3ème semaine ($p < 0,001$) (Fig.). Elles atteignent 472 ± 50 et 505 ± 43 mm^2 à la 5ème semaine ($p < 0,001$).

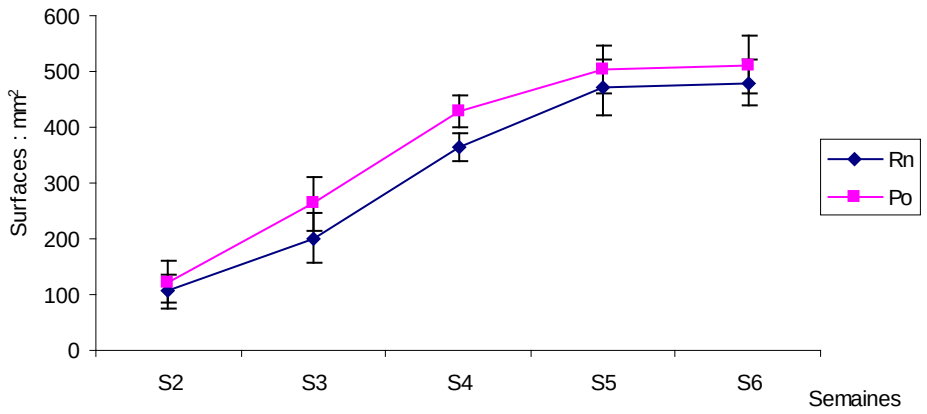


Figure 38 - Estimation des aires de prolifération à partir d'explants d'aorte de CML de R.n et P.o en culture primaire.

Les valeurs sont les moyennes ± l'écart type de 6 déterminations

De la 2ème à la 5ème semaine, il y a une extension du néo-tissu : c'est la 1ère phase de la primoculture. A la 6ème semaine, la prolifération des cellules est freinée ; la courbe d'évolution est marquée par une phase dite de plateau.

Planche II Evolution des CML aortiques de P.o en culture primaire

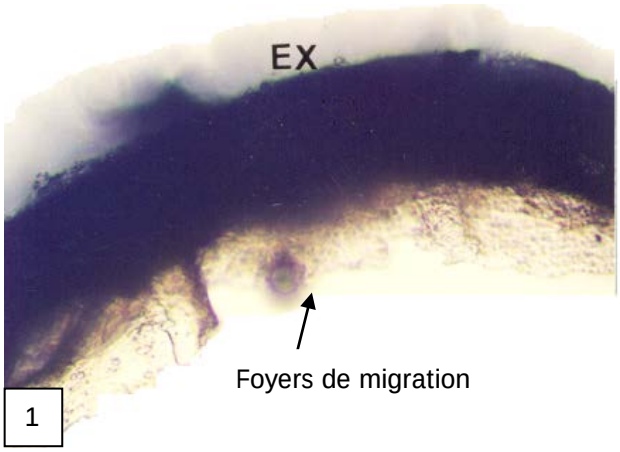


Fig.1– Explant d'aorte de P.o normal fixé à son support. Apparition de Foyers de migration 6 j après la mise en culture. G x 300

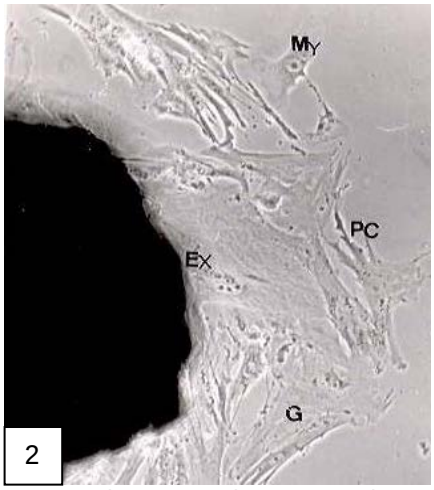


Fig. 2– Début de prolifération. 8 j après la mise en Culture primaire. Les CML de P.o normal Sont contractiles. G x 150

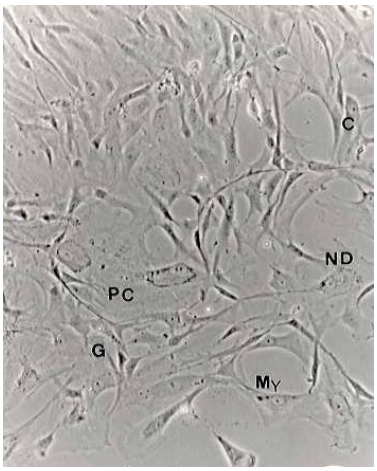


Fig. 3– CML de P.o normal 10 j après la mise en Culture primaire ; état contractile. G x 100

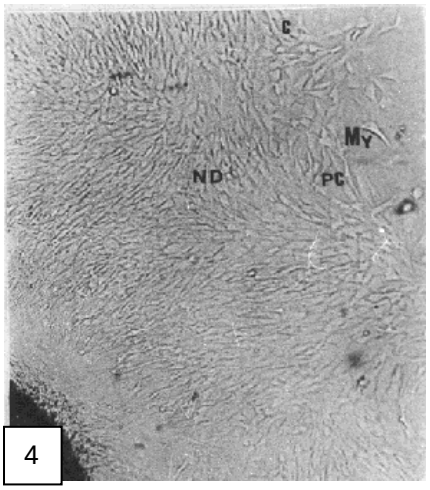


Fig. 4– Prolifération des CML de P.o 15 j après la mise en culture primaire ; elles deviennent synthétiques. G x 70

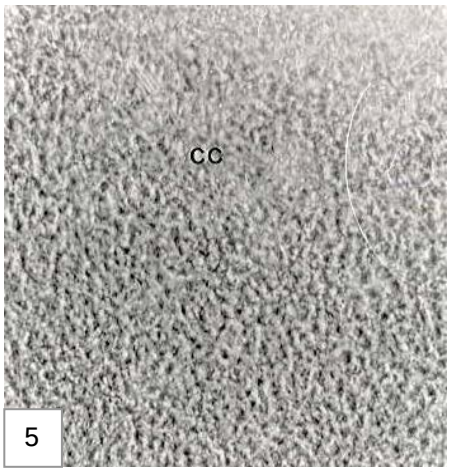


Fig. 5 -CML de P.o ormal en culture primaire à confluence, G x 30.

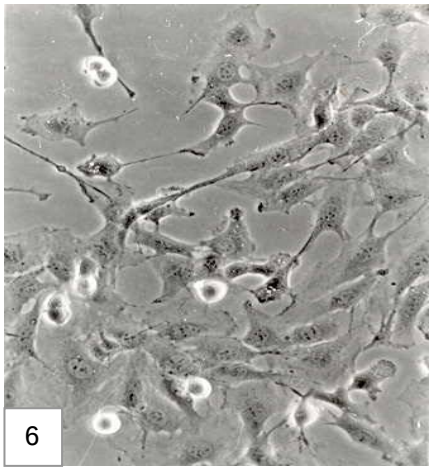


Fig. 6 - CML de P.o normal devenues synthétiques, G x 200.

My : Myocyte ; PC : Prolongement cytoplasmique ; C : cellule ; ND : Noyau en division ; G : Granulations ; CC : Cellules confluentes

la 6ème semaine, les différentes plages se rejoignent et constituent un véritable tapis cellulaire, c'est la confluence.

Au cours de la phase de prolifération et à confluence, les CML apparaissent moins allongées et prennent un aspect polygonal ; elles deviennent synthétiques (Pl. II ; Fig. 5, 6). Les mêmes observations sont relevées dans les CML des deux espèces. Elles sont conformes à celles faites par Bourdillon *et al.* (1977) sur les CML de R.n ; Campbell et Chamley-Campbell (1981) sur les CML porcines qui montrent que les CML aortiques primaires passent spontanément de l'état contractile quiescent à l'état synthétique prolifératif. Ce processus de modulation phénotypique est observé dès le début de la 2ème semaine en accord avec Ross *et al.* (1971), Chamley Campbell *et al.* (1979).

Les CML aortiques en culture primaire se caractérisent donc par un passage spontané de l'état contractile à l'état synthétique et par des divisions successives qui marquent la phase de prolifération. La courbe d'évolution de la surface de prolifération montre une extension progressive du néo-tissu. Cependant, au-delà de la 5ème semaine, une 2ème phase marque la courbe d'évolution par un plateau qui caractérise la phase de confluence (Fig. 38). Selon Bourdillon *et al.* (1976), cette dernière ne correspond pas à une absence de synthèse de DNA, car il y a incorporation de thymidine tritiée, mais résulterait d'un taux de mortalité compensant le nombre de divisions. En effet, l'évaluation de l'accroissement relatif ($\delta S/S$) correspondant au rapport $(S_2 - S_1)/S_1$ montre une diminution régulière au cours de la phase de prolifération (Fig. 39). Cette dernière apparaît de moins en moins importante dans le temps car elle est freinée par un taux de mortalité qui lui est proportionnel.

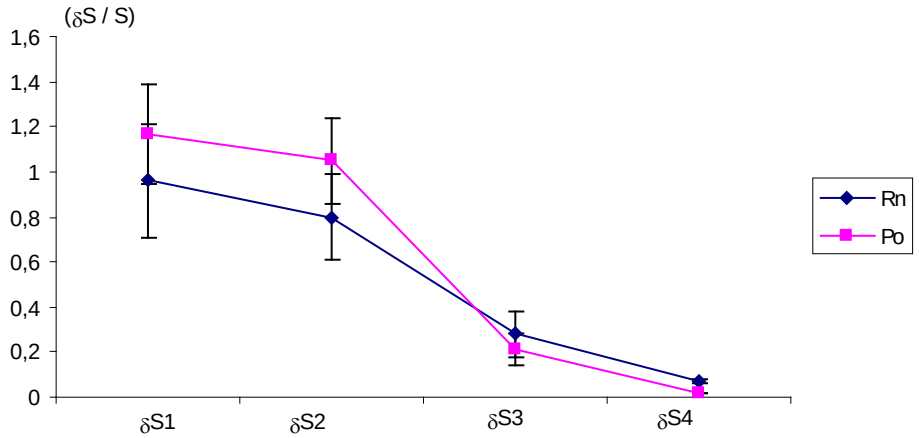


Figure 39 - Détermination de l'accroissement relatif des CML d'aortes de R.n et P.o en culture primaire.

Les valeurs sont les moyennes ± l'écart type de 6 déterminations .

L'accroissement relatif $\delta S / S = (S2 - S1)/S1$ diminue progressivement au cours de la phase proliférative.

II. PROLIFERATION DES CML EN CULTURE SECONDAIRE

Afin de relancer la prolifération cellulaire, l'opération d'ensemencement comme décrite dans les méthodes devient alors nécessaire. La culture secondaire commence dès la première subculture. Les CML de R.n et P.o évoluent de façon analogue.

Deux heures après la trypsinisation, les CML adhèrent au support ; 24h après, elles recommencent à proliférer. A la fin de la 1ère semaine, en phase prolifération, elles présentent leur phénotype synthétique (Pl. III ; Fig. 1, 2). Après 15 jours en subculture, elles arrivent à confluence et deviennent contractiles (Pl. III ; Fig. 3, 4). Comme en primoculture, les CML en culture secondaire subissent spontanément la modulation phénotypique. Elles sont synthétiques en phase de prolifération et à préconfluence ; elles deviennent contractiles à confluence et post- confluence.

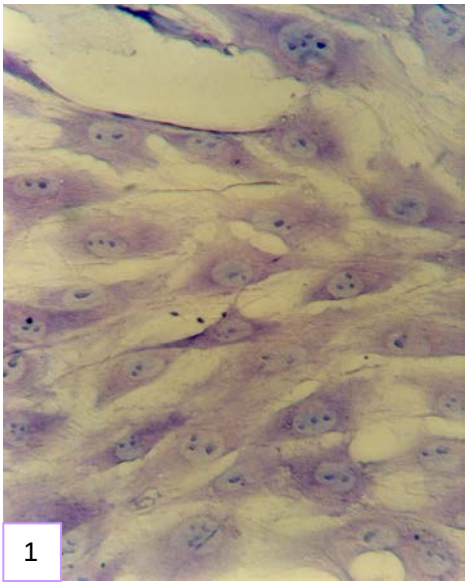
Par ailleurs, à post confluence, les CML en culture secondaire ne subissent pas le phénomène d'inhibition de contact comme les fibroblastes (Bourdillon *et al.*, 1977) mais constituent des multicouches plus ou moins importantes appelées «Hills and Valleys » ; les couches les plus importantes (10 à 15) correspondent aux « Hills » tandis que les « Valleys » ne forment qu'une à trois couches (Pl. III ; Fig. 5).

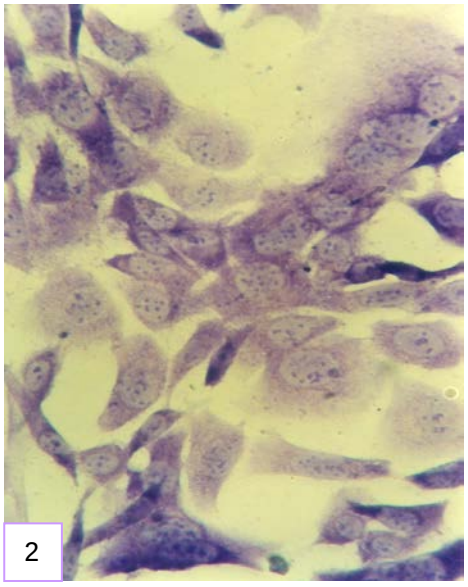
En définitive :

- les CML en culture secondaire comme en culture primaire subissent la modulation phénotypique.

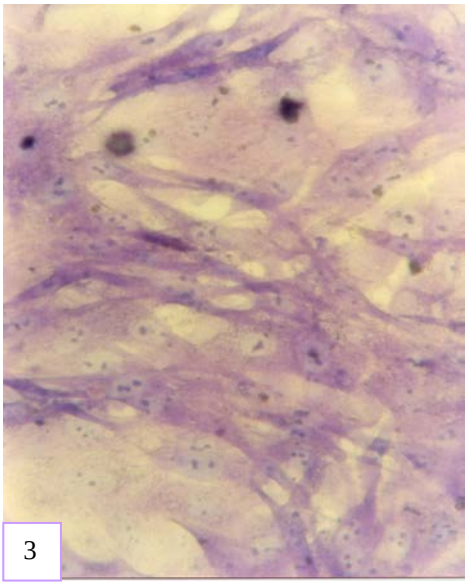
- A confluence, les CML primaires présentent une prolifération freinée par un taux de mortalité qui leur est proportionnel ; les CML secondaires ne subissent pas l'inhibition de contact et constituent des multicouches ou « Hills and Valleys ».

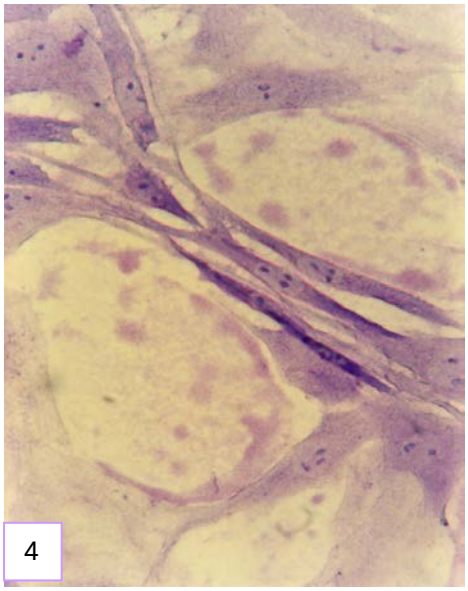
PLANCHE III Evolution des CML de R.n et P.O en culture secondaire





CMLs de R.n (Fig. 1) et P.o (Fig. 2) en culture secondaire au 4ème P, fixées au bouin aqueux et colorées au May Grunwald Giemsa (MGG). Elles présentent un état synthétique et ont un aspect polygonal : c'est la phase proliférative. G x 200





CMLc de R.n (Fig. 3) et P.o (Fig. 4) en culture secondaire au 4ème P, fixées au bouin aqueux et colorées au MGG. Elles présentent le phénotype contractile à confluence avec un aspect fusiforme. G x 200

Fig. 5 – CML de R.n en culture secondaire à post confluence présentant la forme “Hills and Valleys”. CML fixées dans leur milieu d’incubation (DMEM à 2% de SVF) contenant 10% de formol. G x 200

MORPHOMETRIE

Sur les CML de R.n et Po en phase de prolifération (S) et à post confluence (C), fixées et colorées au M.G.G, nous avons évalué dans un premier temps la taille des cellules en mesurant leurs grands axes, ceux de leurs noyaux ainsi que le nombre des nucléoles.

La 2ème partie de cette étude a porté sur les changements induits par de fortes concentrations de glucose à court et long terme et par un état de diabète.

Nous avons en dernier observé l'influence de l'insuline sur les CMLs des deux espèces incubées à long terme dans un milieu enrichi en glucose et sur les CMLs provenant de R.n et P.o diabétiques.

Pour cette étude, nous avons effectué des mesures de 100 cellules prises dans différents champs.

I. LONGUEURS CELLULAIRES MAXIMALES (LC) (Tab. V ; Fig 40)

A. ETAT BASAL

L'évaluation des grands axes cellulaires a montré que les LC des CML contractiles sont supérieures à celles des CML synthétiques : 42,9 ± 9,9 µm contre 32,7 ± 2,7 chez R.n ($p < 0,001$) ; 50,6 ± 6,5 contre 47,2 ± 5,2 µm chez P.o ($p < 0,01$).

Les différences statistiques entre les 2 espèces sont significatives à l'état contractile ($p < 0.01$) et très significative à l'état synthétique ($p < 0,001$).

B. EFFET DU GLUCOSE A COURT ET LONG TERME

1. INCUBATION DE 48H

La présence de glucose pendant 48h dans le milieu d'incubation induit une augmentation sensible des grands axes cellulaires. Aux états contractile et synthétique, nous relevons respectivement 55,0 ± 8,2 et 49,9 ± 7,4 µm chez R.n ($p < 0,01$) pour l'état contractile, ($p < 0.001$) pour l'état synthétique ; 68,8 ± 5,8 et 50,6 ± 11,2 µm chez P.o ($p < 0,01$). Entre les 2 espèces, les différences relevées sont très significatives à l'état contractile ($p < 0,01$) et non significatives à l'état synthétique.

2. INCUBATION DURANT 4 PASSAGES

Après une incubation à long terme dans un milieu enrichi en glucose, les LC augmentent par rapport à l'état basal et à l'incubation de 48h notamment à l'état synthétique (PL. IV ; Fig. 1, 2). A l'état contractile les grands axes cellulaires de R.n et Po atteignent respectivement 63,3 ± 2,9 et 70,8 ± 5,2 µm ($p < 0,05$) (PL. V ; Fig. 1, 3). A l'état synthétique, ils sont de 58,9 ± 6,1 µm chez R.n et 64,7 ± 6,2 chez P.o ($p < 0,001$).

Les grands axes cellulaires des CMLc restent donc supérieurs à ceux des CMLs.

Entre les 2 espèces, les différences statistiques sont très significatives aux deux états phénotypiques ($p < 0,0001$), en faveur de P.o.

TABLEAU V

ANALYSE MORPHOMETRIQUE DES LONGUEURS CELLULAIRES (µm) DES CML DE R.n ET DE P.o EN CULTURE DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES

	Etat	CML de R.n	CML de P.o
N	C	42,9 ± 9,9	50,6 ± 6,5
	S	32,7 ± 2,7	47,2 ± 5,2
N+G48h	C	55,0 ± 8,3 °°	68,8 ± 5,8 °°°
	S	49,9 ± 7,4 ***	50,6 ± 11,2 **
N+G4P	C	63,3 ± 2,9 °°	70,2 ± 5,2 °
	S	58,9 ± 6,1 ***	64,7 ± 6,2 ***
Diab	C	66,5 ± 6,7 °	68,9 ± 6,4 °
	S	61,1 ± 5,6	61,9 ± 5,4 *
N+G4P+Ins	S	49,9 ± 5,3 ¤¤¤ xxxx	49,7 ± 4,6 ¤¤¤¤ xx
Diab+Ins	S	49,8 ± 5,9 ¤¤¤¤ xxx	56,2 ± 6,4 ¤¤¤ xxx

Les valeurs sont les moyennes ± l'écart type de 100 mesures cellulaires de chaque groupe expérimental

Les CML fixées en phase de prolifération (état synthétique ou S) et à P.ost confluence (état contractile ou C) dans le Bouin aqueux sont colorées par le May Grunwald Giemsa dans les conditions d'expérimentation suivantes :

N : CML de *Rattus norvegicus* (R,n) et *Psammomys obesus* (P,o) normaux

N + G 48h : CML de R.n et P.o normaux en présence de glucose 15 mM pendant 48 heures

N + G 4P : CML de R.n et P.o normaux en présence de glucose 15 mM durant 4 passages

Diab : CML de R.n et P.o diabétiques

N + G 4P + Ins : influence de l'insuline (4mU/ml) pendant 48h sur les CMLs incubées à long terme dans un milieu hyperglucosé à 15mM

Diab + Ins : influence de l'insuline à 4 mU/ml sur les CMLs de Diab pendant 48h

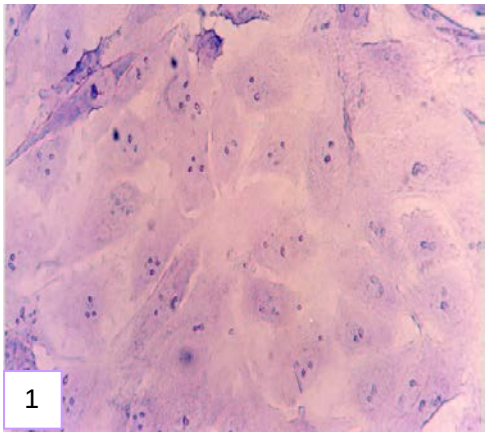
(°) Etat C de Diab ***vs*** état C + G 4P ***vs*** état C + G 48h ***vs*** état basal C

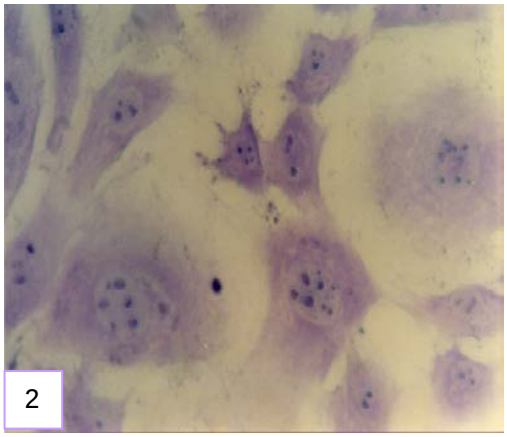
(*) Etat S de Diab ***vs*** état S + G 4P ***vs*** état S + G 48h ***vs*** état basal S

(¤) influence de l'insuline ***vs*** témoins correspondants

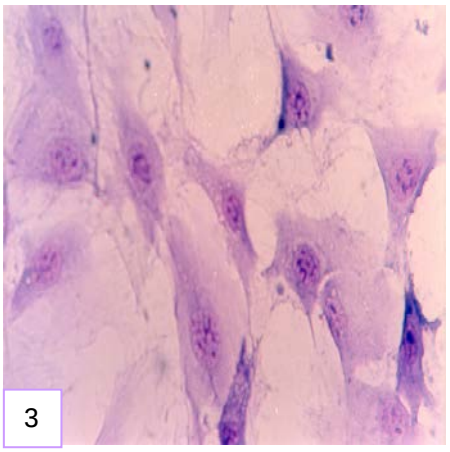
(x) influence de l'insuline ***vs*** état synthétique basal

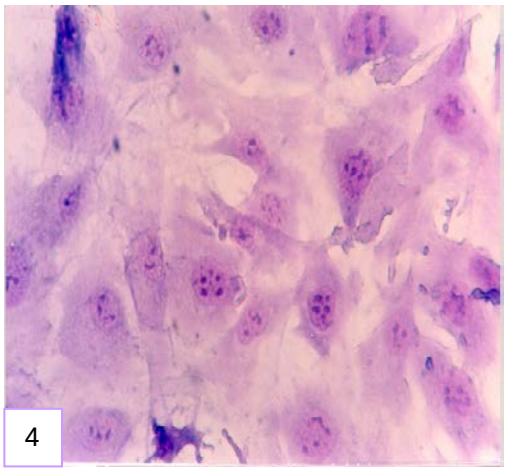
Planche IV. Effet du glucose à long terme et du diabète sur les CML aortiques de R.n et P.o en culture secondaire. Influence de l'insuline.



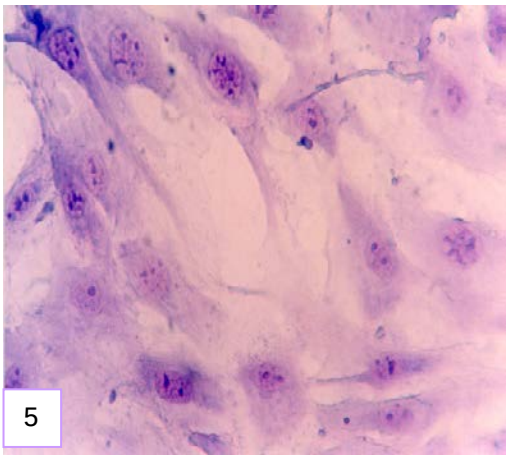


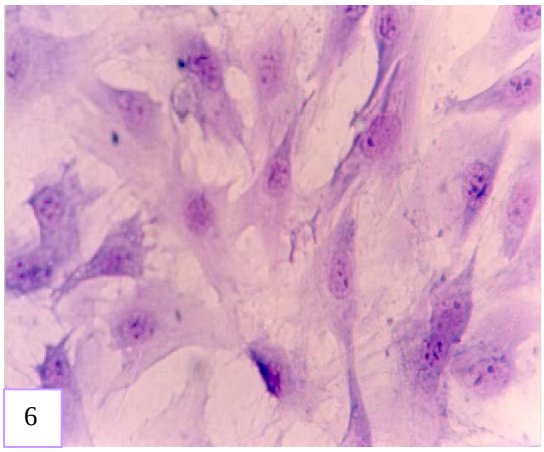
CML synthétiques de R.n (Fig. 1) et P.o (Fig. 2) en culture secondaire, incubées dans un milieu enrichi en glucose durant 4 P. La taille des cellules et le nombre de nucléoles sont augmentés. Les CML sont fixées au bouin aqueux et colorées au MGG. G x 200





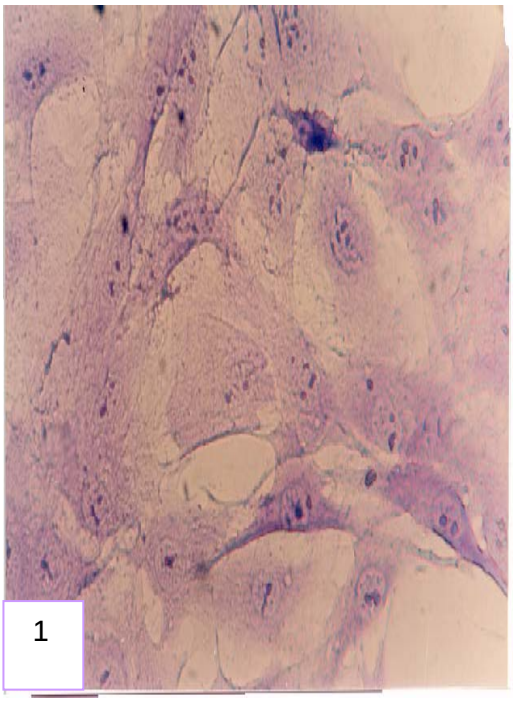
CML synthétiques de R.n diabétique (Fig. 3) et P.o diabétique (Fig. 4) en culture secondaire. De même que dans les CMLs incubées à long terme dans du glucose, la taille des cellules et le nombre de nucléoles sont augmentés. Coloration au MGG, G x 200.

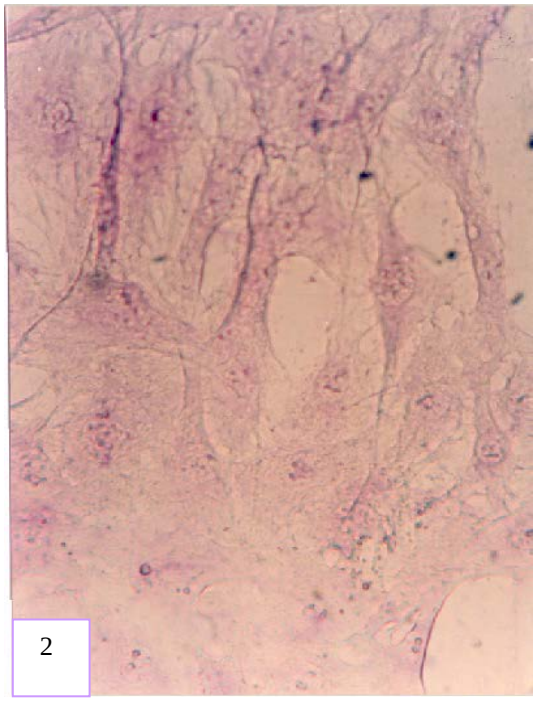




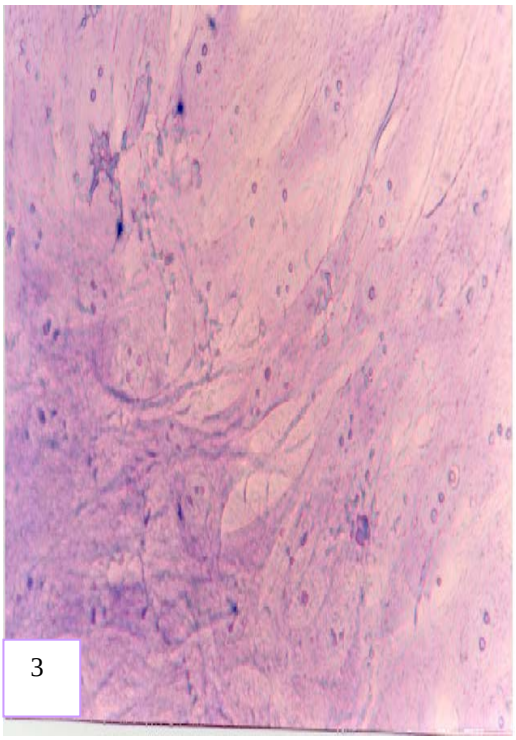
Influence de l'insuline à faible dose, durant 48h, sur les CMLs de R.n diabétique (Fig. 5) et P.o diabétiques (Fig. 6) en culture secondaire. Une diminution sensible de la taille des cellules et du nombre de nucléoles est observée. Coloration au MGG, G x 200.

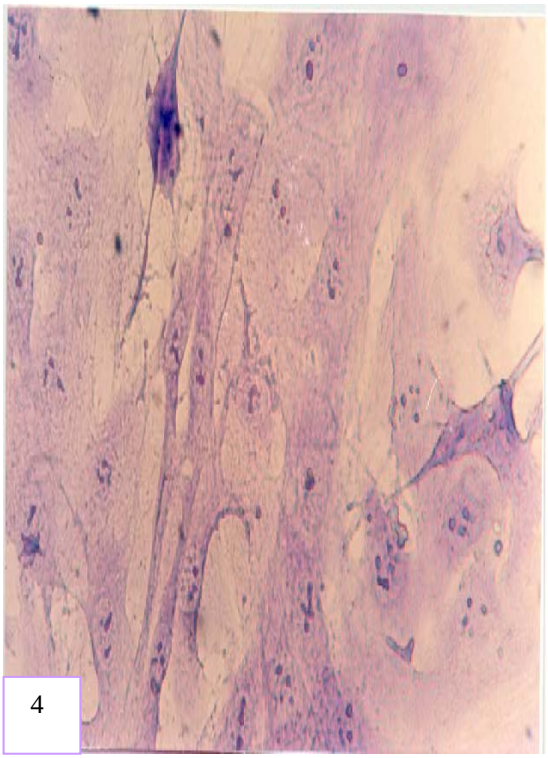
Planche V. Effet du glucose à long terme et du diabète sur les CML de R.n et P.o en subculture





CML contractiles de R.n incubées dans un milieu enrichi en glucose durant 4P (Fig. 1) et CMLc de R.n diabétique (Fig 2). La taille des cellules et le nombre des nucléoles sont augmentés.
Les CML sont fixées dans du bouin aqueux et colorées au MGG. G x 200.





CML contractiles de P.o incubées dans un milieu enrichi en glucose durant 4P (Fig. 3) et CMLc de P.o diabétique (Fig. 4). La taille des cellules et le nombre des nucléoles sont augmentés.
Les CML sont fixées dans du bouin aqueux et colorées au MGG. G x 200.

C. FFETS DES DIABETES (DNID ET DID)

Les LC maximales des CML de diabétiques sont très augmentées par rapport à l'état basal. Ainsi, les CML de R.n et de Po présentent respectivement à leurs états contractile et synthétique des LC maximales de 66,5 ± 6,7et 61,1 ± 5,6 µm ; 68,9 ± 6,4 et 61,9 ± 5,4 µm ($p < 0.0001$). En revanche, elles sont peu modifiées par rapport à l'incubation de 4 passages (PL. IV ; Fig. 3, 4), (PL V ; Fig. 2,4). En effet, les différences statistiques ne sont pas significatives pour les CMLc et s de R.n ; elles sont peu significatives pour les CMLc et s de P.o ($p < 0,05$). Si on compare les 2 espèces, les différences sont peu significatives à l'état contractile et non significatives à l'état synthétique.

D'après les résultats obtenus, les CML évoluent de façon comparable pour les deux types de diabète étudiés.

D. INFLUENCE DE L'INSULINE

L'action de l'insuline à faible dose (4 mU/ml) pendant une période de 48h est observée sur les CML synthétiques de R.n et Po incubées à long terme dans du glucose et celles provenant d'animaux diabétiques.

Elle agit très favorablement sur la taille des cellules puisqu'elle induit une diminution sensible des LC maximales (PL. IV ; Fig. 5, 6). Ces dernières sont respectivement de 49,9 ± 5,3 et 49,7 ± 5,9 µm dans les CMLs de R.n et de Po incubées durant 4 passages (p : NS). Les CMLs de diabétiques soumises à l'insuline présentent des LC équivalentes à 49,8 ± 5,9 chez R.n ($p < 0,0001$) et 56,2 ± 6,4 µm chez Po ($p < 0,001$). La diminution relevée est statistiquement très significative mais les grands axes cellulaires restent toutefois supérieurs aux valeurs normales ($p < 0,01$ pour R.n ; $p < 0,0001$ pour Po).

Les comparaisons interspécifiques ne montrent pas de différence après l'incubation au glucose à long terme. Elle est significative à l'état diabétique ($p < 0,01$).

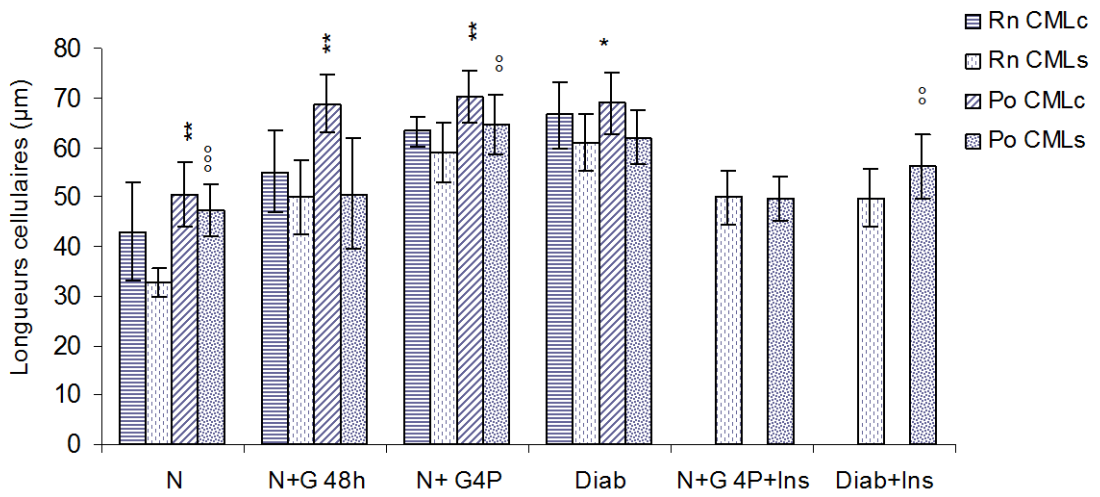


Figure 40 - Longueurs cellulaires maximales des CML d'aortes de R.n et P.o en culture secondaire dans différentes conditions expérimentales, aux phénotypes contractile et synthétique.

Les grands axes cellulaires de P.o sont plus importants (à l'état C et S) que ceux de R.n.
Ils augmentent sensiblement sous l'effet du glucose à 15 mM notamment après une incubation à long terme (4P).
A l'état diabétique, l'évolution est comparable à celle de l'incubation à long terme pour les CML des deux espèces.
L'insuline à faible dose (4 mU/ml) additionnée pendant 48h au milieu d'incubation induit une diminution significative des LC comparativement aux témoins correspondants.
Les valeurs sont les moyennes de 100 mesures cellulaires affectées de l'écart type. Les comparaisons établies sont interspécifiques.
(*) Etats C de P.o ***vs*** états C de R.n
(°) Etats S de P.o ***vs*** états S de R.n

II. LONGUEURS NUCLEAIRES MAXIMALES OU LN (Tab. VI ; Fig. 41)

A. ETAT BASAL

Contrairement aux grands axes cellulaires, les longueurs nucléaires maximales (LN) sont moins importantes à l'état contractile qu'à l'état synthétique. Nous relevons 13,0 ± 3,1 et 16,5 ± 2,2 µm pour les CMLc ($p < 0,01$) ; 19,2 ± 3,3 et 21,6 ± 1,9 µm pour les CML synthétiques ($p < 0,01$). Aux deux états considérés (contractile et synthétique), les différences entre les deux espèces sont peu significatives.

B. EFFET DU GLUCOSE A COURT ET LONG TERME

1. INCUBATION DE 48H

A l'état contractile, en présence de glucose pendant 48h, les LN maximales augmentent significativement dans les CML de R.n ($p < 0,001$) mais sont peu modifiées dans les CMLc de Po ($p < 0,05$).

A l'état synthétique, elles sont statistiquement augmentées et atteignent respectivement 23,5 ± 3,7 µm dans les CMLs de R.n et 25,9 ± 5,2 µm dans les CMLs de Po ($p < 0,01$).

Les différences enregistrées entre les deux espèces sont significatives aux deux états phénotypiques étudiés ($p < 0,01$).

2. INCUBATION DURANT 4 PASSAGES

Après une incubation de 4P dans du glucose, des effets remarquables observés dans les CML des deux espèces montrent leur sensibilité en présence de concentrations élevées de glucose (PL IV). Ainsi, comparativement à l'état basal, les LN maximales augmentent très significativement pour les deux états cellulaires et chez les deux espèces étudiées. Par rapport à l'incubation de 48h, celle de 4 passages induit également une augmentation statistiquement significative des LN à l'exception de celles des CMLc de R.n qui sont peu modifiées (20,5 ± 1,6 *vs* 19,5 ± 2,6 µm ; $p < 0,05$).

Des différences interspécifiques sont entre les CML synthétiques de R.n et P.o ($p < 0,01$).

C. EFFET DES DIABETES (DNID, DID)

Les CML de diabétiques présentent des grands axes nucléaires très augmentés par rapport à l'état basal et à l'incubation de 48h. En revanche, ils sont peu modifiés comparativement à ceux relevés après effet du glucose à long terme (PL IV). Nous avons enregistré des différences peu significatives dans les CMLc de R.n et non significatives dans les autres types de cellules.

L'analyse statistique entre les deux espèces, se révèle non significative à l'état C et significative à l'état S (30,8 ± 3,4 dans les CMLs de Po *vs* 26,4 ± 3,4 µm dans CMLs de R.n).

D. INFLUENCE DE L'INSULINE

L'action de l'insuline à faible dose (4mU/ml) pendant 48h a été étudiée sur les CML à l'état synthétique uniquement, après une incubation au glucose de 4P et sur les CML provenant d'animaux diabétiques.

TABLEAU VI

ANALYSE MORPHOMETRIQUE DES LONGUEURS NUCLEAIRES DES CML DE R.n ET DE P.o EN CULTURE DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES

	Etat	CML de R.n	CML de P.o
N	C	13,0 ± 0,12	16,5 ± 2,2
	S	19,2 ± 3,3	21,6 ± 1,9
N+G48h	C	19,2 ± 2,6 °°°	17,9 ± 2,7 °
	S	23,5 ± 3,7 **	25,9 ± 5,2 **
N+G4P	C	20,5 ± 1,6 °	21,1 ± 2,7 °°°
	S	27,3 ± 4,3 **	30,7 ± 4,6 **
Diab	C	21,4 ± 3,0 °	21,1 ± 2,0
	S	26,4 ± 3,4	30,8 ± 3,4
N+G4P+Ins	S	19,5 ± 2,9 ¤¤¤	24,1 ± 3,7 ¤¤¤ xx
Diab+Ins	S	24,6 ± 2,8 ¤¤ xx	26,4 ± 3,5 ¤¤¤ xx

Les valeurs sont les moyennes ± l'écart type de 100 mesures nucléaires de chaque groupe expérimental
Les CML fixées en phase de prolifération (état synthétique ou S) et à P.ost confluence (état contractile ou C) dans le Bouin aqueux sont colorées par le May Grunwald Giemsa dans les conditions d'expérimentation suivantes :
N : CML de *Rattus norvegicus* (R,n) et *Psammomys obesus* (P,o) normaux
N + G 48h : CML de R.n et P.o normaux en présence de glucose 15 mM pendant 48 heures
N + G 4P : CML de R.n et P.o normaux en présence de glucose 15 mM durant 4 passages
Diab : CML de R.n et P.o diabétiques
N + G 4P + Ins : influence de l'insuline (4mU/ml) pendant 48h sur les CMLs incubées à long terme dans un milieu hyperglucosé à 15 mM
Diab + Ins : influence de l'insuline à 4 mU/ml sur les CMLs de Diab pendant 48h

(°) Etat C de Diab ***vs*** état C+ G 4P ***vs*** état C + G 48h ***vs*** état basal C
(*) Etat S de Diab ***vs*** état S + G 4P ***vs*** état S + G 48h ***vs*** état basal S
(¤) influence de l'insuline ***vs*** témoins correspondants
(x) influence de l'insuline ***vs*** état synthétique basal

Sous l'effet de l'insuline, les grands axes nucléaires diminuent très sensiblement et les différences relevées par rapport aux témoins correspondants sont très significatives ($p < 0,001$). Toutefois, les valeurs restent statistiquement supérieures à celles des témoins normaux ($p < 0,01$) sauf dans le cas des CMLs de R.n incubées durant 4P au glucose qui présentent une LN comparable à celle des témoins correspondants.

Les comparaisons interspécifiques sont significatives après incubation de 4P ($p < 0,01$) et peu significatives à l'état diabétique ($p < 0,05$).

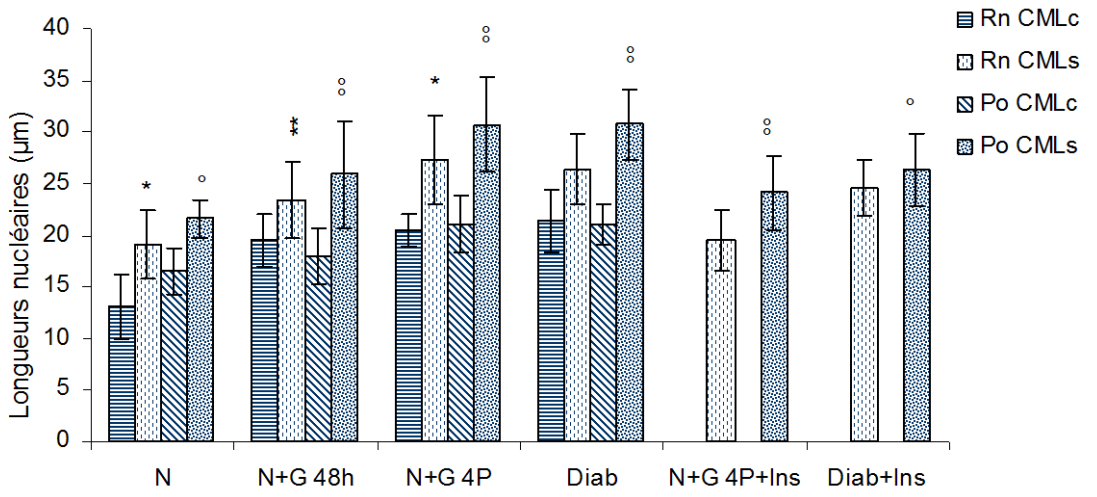


Figure 41 - Longueurs nucléaires maximales des CML de R.n et P.o en culture secondaire dans différentes conditions expérimentales, aux phénotypes C et S.

Les longueurs nucléaires maximales des CML de P.o sont peu différentes de celles de R.n aux états C et S.
Une augmentation sensible est observée en particulier sous l'influence à long terme et à l'état du diabète ; elle est plus marquée dans les CML de P.o.
L'insuline diminue la taille des noyaux sans atteindre la taille des témoins.
Les valeurs sont les moyennes de 100 mesures cellulaires affectées de l'écart type. Les comparaisons établies sont interspécifiques.
(*) Etats C de P.o ***vs*** états C de R.n
(°) Etats S de P.o ***vs*** états S de R.n

III. NUMERATION DES NUCLEOLES (Tab. VII ; Fig. 42)

A. ETAT BASAL

Le nombre des nucléoles est en moyenne inférieur à 2 aux états contractiles des deux espèces étudiées. A l'état synthétique, il est de 2 ± 0,9 dans les CML de R.n et statistiquement plus élevé dans les CML de P.o (3,2 ± 0,9).

B. EFFET DU GLUCOSE A COURT ET LONG TERME

1. INCUBATION DE 48H

Le nombre de nucléoles s'élève sensiblement sous l'effet de glucose pendant 48h, notamment à l'état synthétique : 3,2 ± 1,0 dans les CML de R.n ($p < 0,0001$) et 3,4 ± 1,0 dans les CML de P.o (p 0,01).
La différence enregistrée entre les deux espèces est peu significative à l'état synthétique ($p < 0.05$) et significative à l'état contractile ($p < 0,01$).

TABLEAU VII

EVALUATION DU NOMBRE DE NUCLEOLES CONTENUS DANS LES CML DE R.n ET DE P.o EN CULTURE DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES

	Etat	CML de R.n	CML de P.o
N	C	1,8 ± 0,7	1,9 ± 0,7
	S	2,0 ± 0,9	3,2 ± 0,9
N+G48h	C	1,9 ± 0,6 °	2,4 ± 0,7 °°°°
	S	3,2 ± 1,0 ****	3,4 ± 0,7 **
N+G4P	C	2,5 ± 0,9 °°°°	2,7 ± 0,9 °°
	S	3,5 ± 1,1 *	3,7 ± 1,2 **
Diab	C	3,25 ± 0,8 °°°	3,8 ± 1,0 °°°°
	S	3,9 ± 1,4 *	4,9 ± 1,3 **
N+G4P+Ins	S	2,6 ± 0,9 ¤¤¤ xx	3,0 ± 0,7 ¤¤¤ xx
Diab+Ins	S	3,3 ± 0,9 ¤¤¤ xxxx	3,7 ± 0,8 ¤¤¤¤ xx

Les valeurs sont les moyennes ± l'écart type de 100 mesures nucléaires de chaque groupe expérimental
Les CML fixées en phase de prolifération (état synthétique ou S) et à P.ost confluence (état contractile ou C) dans le Bouin aqueux sont colorées par le May Grunwald Giemsa dans les conditions d'expérimentation suivantes :
N : CML de *Rattus norvegicus* (R,n) et *Psammomys obesus* (P,o) normaux
N + G 48h : CML de R.n et P.o normaux en présence de glucose 15 mM pendant 48 heures
N + G 4P : CML de R.n et P.o normaux en présence de glucose 15 mM durant 4 passages
Diab : CML de R.n et P.o diabétiques
N + G 4P + Ins : influence de l'insuline (4mU/ml) pendant 48h sur les CMLs incubées à long terme dans un milieu hyperglucosé à 15 mM
Diab + Ins : influence de l'insuline à 4 mU/ml sur les CMLs de Diab pendant 48h

(°) Etat C de Diab ***vs*** état C+ G 4P ***vs*** état C + G 48h ***vs*** état basal C
(*) Etat S de Diab ***vs*** état S + G 4P ***vs*** état S + G 48h ***vs*** état basal S
(¤) influence de l'insuline ***vs*** témoins correspondants
(x) influence de l'insuline ***vs*** état synthétique basal

2. INCUBATION DE 4 PASSAGES

Après l'incubation à long terme, le nombre de nucléoles augmente significativement aux deux états phénotypiques C et S (PL. IV ; Fig. 1, 2). Il est respectivement de 2,5 ± 0,9 et 2,7 ± 0,9 dans les CMLc de R.n et P.o. Il atteint 3,5 ± 1 dans les CMLs de R.n et 3,7 ± 1,2 dans les CMLs de P.o. Au phénotype contractile comme au phénotype synthétique, les différences entre les deux espèces se révèlent non significatives.

C. EFFET DES DIABETES

Dans les CML de diabétiques, à l'état contractile, le nombre de nucléoles est supérieur à 3. Comparée aux conditions expérimentales précédentes, la différence statistique se révèle significative (Tab. VII).

A l'état synthétique , le nombre de nucléoles augmente statistiquement ; il est égal à 3,9 ± 1.4 dans les CML de R.n ($p < 0,05$) et 4,9 ± 1,3 dans les CML de P.o diabétique ($p < 0.01$) (PL. IV ; Fig. 3, 4). Les différences interspécifiques apparaissent peu significatives à l'état contractile et significatives à l'état synthétique

D. INFLUENCE DE L'INSULINE

L'insuline diminue sensiblement le nombre de nucléoles dans toutes les conditions expérimentales étudiées dans un rapport moyen de 1,2 (PL. IV ; Fig. 5, 6).

Les comparaisons interspécifiques montrent des différences peu significatives dans les différentes conditions d'expérience sous l'action de l'insuline.

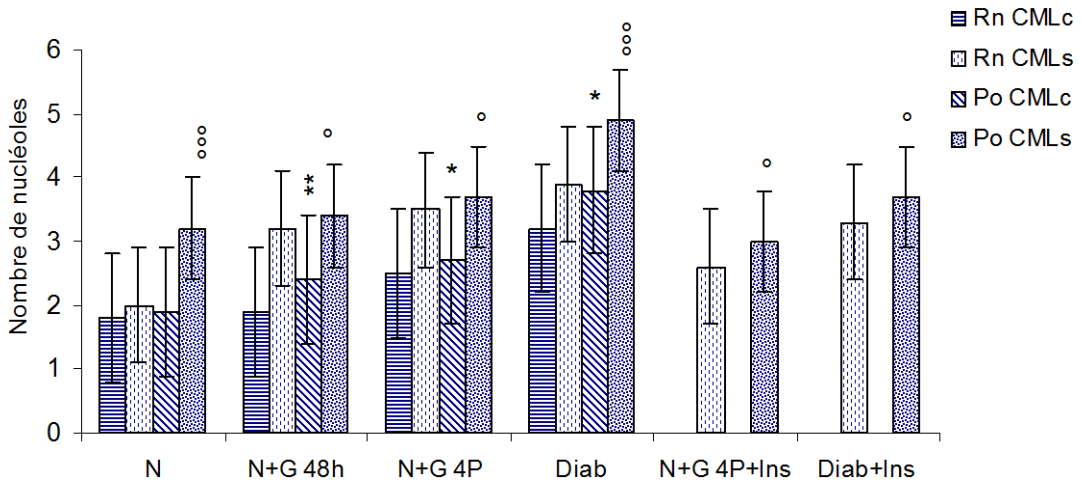


Figure 42 - Nombre de nucléoles dans les CML de R.n et P.o en culture secondaire dans différentes conditions expérimentales aux phénotypes C et S.

Les comparaisons interspécifiques montrent qu'à l'état basal, le nombre de nucléoles est plus élevé dans les CMLs de P.o. Une augmentation est observée après les incubations à court et long terme, elle est comparable pour les deux espèces. A l'état diabétique,le nombre de nucléoles est plus représenté dans les CMLs de P.o. L'influence de l'insuline diminue de façon comparable le nombre de nucléoles.

Les valeurs sont les moyennes de 100 mesures cellulaires affectées de l'écart type.

(*) Etats C de P.o ***vs*** états C de R.n

(°) Etats S de P.o ***vs*** états S de R.n

E. CONCLUSION

L'étude morphométrique a permis de distinguer différents points :

- **A l'état contractile basal, les grands axes cellulaires sont plus élevés et les grands axes nucléaires plus faibles qu'à l'état synthétique, au sein des deux espèces.**
- **Les grands axes cellulaires et nucléaires des CML du P.o ainsi que le nombre de nucléoles sont supérieurs à ceux des CML de R.n aux deux états phénotypiques C et S étudiés.**
- **La présence de glucose à court et long terme dans le milieu d'incubation induit une augmentation des grands axes cellulaires et nucléaires aux deux états considérés. L'évolution est comparable pour les deux espèces étudiées.**
- **L'état diabétique augmente significativement les grands axes cellulaires et nucléaires par rapport à l'état basal et à l'incubation de 48h. Cette augmentation est peu significative par rapport à l'incubation à long terme.**
- **Le nombre de nucléoles plus important à l'état S que C de base est statistiquement très augmenté à l'état diabétique notamment dans les CMLs de P.o.**
- **L'insuline induit une diminution sensible des différents paramètres, notamment les grands axes nucléaires, qui restent toutefois supérieurs aux valeurs témoins.**

CHAPITRE II :

ETUDE DE LA BIOSYNTHESE DES PROTEINES ET DES COLLAGENES TOTAUX PAR LES CML AORTIQUES EN CULTURE SECONDAIRE

BIOSYNTHESE DES PROTEINES ET DES COLLAGENES TOTAUX

Cette étude a porté sur l'évaluation de plusieurs paramètres : l'estimation des contenus extra- et intracellulaires en protéines et en collagènes, la biosynthèse globale de ces paramètres et le taux global des collagènes totaux. La sécrétion des protéines et des collagènes est déduite du contenu total en protéines et en collagènes.

Les valeurs de certains paramètres (synthèse globale des collagènes, répartition des protéines et des collagènes contenus dans les deux compartiments, répartition globale) sont signalés en annexe.

I. BIOSYNTHESE DES PROTEINES TOTALES (Tab. VIII, IX)

La synthèse des protéines totales, exprimée en cpm/10^6 cellules, est déterminée par la mesure de l'incorporation de la proline tritiée dans le milieu (compartiment extracellulaire ou CEC et dans les cellules (compartiment intracellulaire ou CIC).

La sécrétion des protéines totales exprimée en pourcentage représente la radioactivité incorporée dans le milieu par rapport à la radioactivité totale contenue dans le milieu et les cellules.

Ces paramètres sont déterminés dans différentes conditions d'expérience :

- CML de R.n et P.o à l'état basal (contractile et synthétique)
- CML incubées dans un milieu enrichi en glucose durant 48h et 4P
- CML provenant de R.n et P.o diabétiques
- CML synthétiques incubées à long terme dans un milieu contenant du glucose 15 mM et celles provenant de R.n et P.o diabétiques après action de l'insuline à faible dose (4mU/ml) pendant 48h.

A. ETAT BASAL (FIG. 43)

1. ETAT CONTRACTILE

L'évaluation de la synthèse de protéines totales contenue dans les deux compartiments (milieu et cellules), ne montre pas de différence significative entre les CML des deux espèces étudiées (558 ± 93 cpm/10^6 cellules dans les CML de R.n *vs* 504 ± 24 cpm/10^6 cellules dans les CML de P.o). Cependant, l'analyse dans les différents compartiments montre une répartition différente.

Dans les CMLc de R.n, l'incorporation de la proline tritiée est plus élevée dans le compartiment intracellulaire (CIC) que dans le compartiment extracellulaire (CEC) : 425 ± 79 cpm contre 133 ± 26 cpm/10^6 cellules ($p < 0,0001$). Dans les CMLc de P.o, les 2 compartiments présentent une incorporation équivalente (214 ± 21cpm/ 10^6 cellules dans le CEC, 290 ± 12 cpm/10^6 cellules dans le CIC).

٢. *ETAT SYNTHETIQUE*

Comparativement à l'état contractile, l'incorporation de la proline tritiée dans les protéines totales est significativement plus élevée dans les CMLs de R.n et de P.o ($p < 0,0001$). Elle est estimée respectivement à 1188 ± 108 cmp/10^6 cellules et 1749 ± 239 cpm/10^6 cellules ($p < 0,001$).

Une fois répartie dans les différents compartiments des CMLs de R.n et de P.o, la radioactivité apparaît plus importante dans le CEC que dans le CIC ($p < 0,01$) ; elle est

TABLEAU VIII

BIOSYNTHESE DES PROTEINES TOTALES (cpm / 10^6 cellules) DANS LES CML DE R.n ET P.o EN CULTURE SECONDAIRE, DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES

R.n

	Etat	CEC		CIC		Synthèse Globale	
N	C	133 ± 26		425 ± 79	$^{+++}$	558 ± 93	
	S	798 ± 68		389 ± 57	$^{+++}$	1188 ± 108	
N+G48h	C	224 ± 25	°°°	453 ± 67	° $^{++}$	677 ± 49	°°
	S	971 ± 93	*	482 ± 35	** $^{++++}$	1453 ± 110	**
N+G4P	C	599 ± 68	°°°°	456 ± 33	$^{++}$	1055 ± 84	°°°°
	S	1763 ± 163	****	1294 ± 364	**** $^{++}$	3056 ± 511	****
Diab	C	2934 ± 403	°°°°	2830 ± 415	°°°°	5764 ± 371	°°°°
	S	3603 ± 255	****	3000 ± 544	****	6602 ± 444	****
N+G4P+Ins	S	840 ± 82	¤¤¤	1838 ± 108	¤¤ xxx $^{++++}$	2678 ± 86	¤ xxxx
Diab+Ins	S	1070 ± 109	¤¤¤¤ xx	1720 ± 96	¤¤¤ xxxx $^{+++}$	2740 ± 238	¤¤¤¤ xxxx

P.o

	Etat	CEC		CIC		Synthèse Globale	
N	C	214 ± 21		290 ± 12		504 ± 24	
	S	981 ± 176		770 ± 143	$^{+++}$	1749 ± 239	
N+G48h	C	241 ± 18	°	487 ± 77	°°° $^{+++}$	728 ± 81	°°
	S	1253 ± 157	*	989 ± 32	** $^{++}$	2246 ± 148	**
N+G4P	C	1212 ± 101	°°°°	985 ± 94	°°°° $^{++}$	2197 ± 141	°°°°
	S	2452 ± 280	****	2138 ± 287	****	4590 ± 225	****
Diab	C	3546 ± 325	°°°	2776 ± 187	°°° $^{+}$	6322 ± 291	°°°°
	S	4777 ± 154	****	3150 ± 84	* $^{+++}$	7927 ± 140	**
N+G4P+Ins	S	1009 ± 122	¤¤¤¤	1892 ± 283	xxxx $^{++}$	2740 ± 238	¤¤¤¤ xx
Diab+Ins	S	999 ± 88	¤¤¤¤	1964 ± 242	¤¤¤¤ xxxx $^{++}$	2963 ± 261	¤¤¤ xxxx

Les CML en culture secondaire sont utilisées à un stade précoce ($4^{ème}$ passage)

Nombre de cellules en phase de prolifération (état synthétique) : 10^6 cellules

Nombre de cellules à post confluence (état contractile) : 2,5 x 10^6 cellules

Les CML sont incubées avec de la proline tritiée (^{3}H Pro). L'incorporation dans les protéines totales est déterminée par la radioactivité du CEC et du CIC (milieu + cellules).

Les valeurs sont les moyennes de six déterminations ± l'écart type

(°) Etat C de Diab ***vs*** état C + G 4P ***vs*** état C + G 48h ***vs*** état basal C

(*) Etat S de Diab ***vs*** état S + G 4P ***vs*** état S + G 48h ***vs*** état basal S

(¤) influence de l'insuline ***vs*** témoins correspondants

(x) influence de l'insuline ***vs*** état synthétique basal ; (+) CEC vs CIC

respectivement de 798 ± 68 et 981 ± 176 cpm/10^6 cellules *vs* 389 ± 57 et 770 ± 143 cpm/10^6 cellules.

Les différences statistiques relevées entre les compartiments respectifs des CMLs de R.n et P.o sont peu significatives pour les CEC ($p < 0,05$) et très significatives pour les CIC ($p < 0,001$).

La sécrétion des protéines totales est plus élevée à l'état synthétique que contractile (x 4,8 pour les CML R.n et x 3 Pour les CML de P.o) (Fig. 59). La différence entre les deux espèces est peu significative aux deux états phénotypiques C et S ($p < 0,05$).

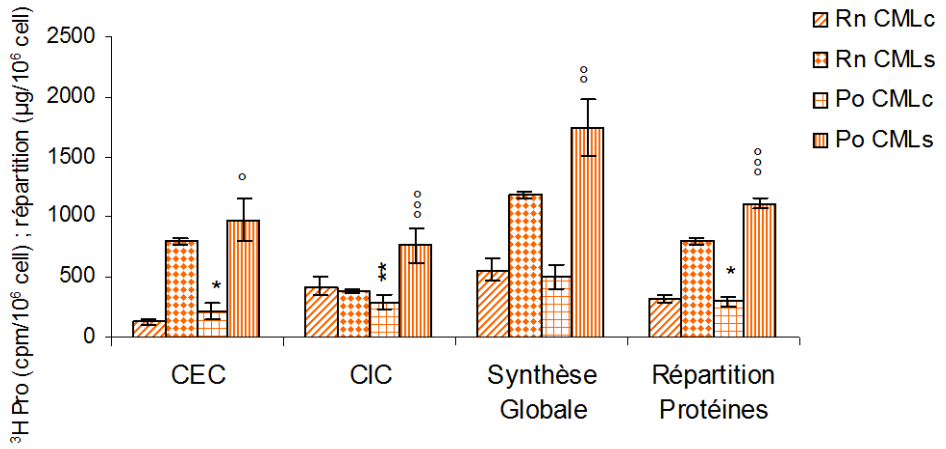


Figure 43 - Incorporation de ^{3}H Pro dans les protéines totales des CML de R.n et P.o en culture secondaire à leurs phénotypes contractile (C) et synthétique (S) de l'état basal.
La radioactivité (^{3}H Pro) contenue dans le milieu (CEC) et dans les cellules (CIC) est exprimée en cpm/10^6 cellules.
La synthèse globale est celle contenue dans les deux compartiments.
La répartition protéique déterminée par la méthode de Bradford (1976) est exprimée en µg/10^6 cellules.
Les valeurs correspondent à la moyenne ± l'écart type de six déterminations.
(*) Etat C des CML de P.o ***vs*** état C des CML de R.n
(°) Etat S de P.o ***vs*** état S des CML de R.n
L'analyse statistique entre état C et S a révélé des différences très significatives pour les deux espèces ($p < 0,0001$) à l'exception du CIC des CML de R.n où la différence est peu significative ($p < 0,05$).

B. EFFET D'UNE INCUBATION AU GLUCOSE A COURT ET LONG TERME

1. INCUBATION PENDANT 48H (FIG. 44)

En présence de concentrations élevées de glucose, nous notons une augmentation de l'incorporation de la proline dans les différents compartiments et une élévation de la synthèse globale des protéines dans les CML contractiles et synthétiques de R.n et de P.o ($p < 0,01$).

Les différences relevées entre les deux espèces sont peu significatives à l'état C ($p < 0,05$) et très significatives à l'état S ($p < 0,001$).

A l'état contractile, l'incorporation de la proline tritiée demeure plus importante dans le CIC que dans le CEC (453 ± 67 *vs* 224 ± 25 cpm/10^6 cellules pour les CML de R.n ; 487 ± 77 *vs* 241 ± 18 cpm/10^6 cellules pour les CML de P.o ($p < 0,001$).

A l'état synthétique, l'incorporation de la proline tritiée est significativement plus représentée dans le CEC que dans le CIC ($p < 0,001$).

TABLEAU IX

SECRETION DES PROTEINES TOTALES PAR LES CML DE R.n ET DE P.o EN CULTURE SECONDAIRE DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES (%)

	Etat	CML de Rn		CML de Po	
N	C	7,0 ± 1,1		11,8 ± 1,0	
	S	33,6 ± 1,6		37,2 ± 4,2	
N+G48h	C	13,3 ± 2,0	°	13,7 ± 1,1	°
	S	44,3 ± 1,7	**	55,8 ± 3,8	***
N+G4P	C	28,5 ± 1,6	°°	31,6 ± 1,7	°°
	S	58,5 ± 4,4	***	65,3 ± 9,2	*
Diab	C	50,9 ± 4,11	°°°	55,3 ± 3,1	°°°
	S	79,1 ± 7,3	***	85,9 ± 1,2	**
N+G4P+Ins	S	31,6 ± 3,1	¤¤¤	35,7 ± 6,0	¤¤¤
Diab+Ins	S	32,4 ± 1,9	¤¤¤¤	39,7 ± 3,9	¤¤¤¤

Le taux de protéines sécrétées correspond à la radioactivité du milieu par rapport à la radioactivitéle totale (incorporée dans le milieu et dans les cellules)

Les valeurs sont les moyennes de six déterminations ± l'écart type

(°) Etat C de Diab ***vs*** état C + G 4P ***vs*** état C+ G 48h ***vs*** état basal C

(*) Etat S de Diab ***vs*** état S + G 4P ***vs*** état S + G 48h ***vs*** état basal S

(¤) influence de l'insuline ***vs*** témoins correspondants

(x) influence de l'insuline ***vs*** état synthétique basal

Dans les CML des deux espèces étudiées, la sécrétion des protéines totales est peu modifiée aux états contractiles mais augmente significativement aux états synthétiques (Fig. 59).

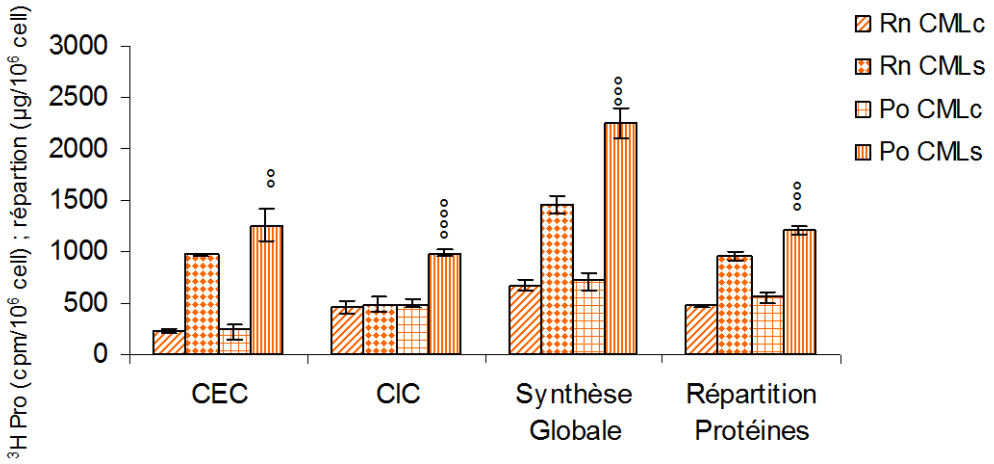


Figure 44 - Effets de concentrations élevées de glucose (15 mM) pendant 48h sur l'incorporation de ^{3}H Pro dans les protéines totales des CML de R.n et P.o en culture secondaire aux phénotypes C et S.

Les valeurs sont les moyennes ± l'écart type de six déterminations.
(*) Etat C des CML de P.o ***vs*** état C des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o ***vs*** état S des CML de R.n
L'analyse statistique entre état C et S a révélé des différences très significatives pour les deux espèces ($p < 0.0001$) à l'exception du CIC des CML de R.n où la différence n'est pas significative.

2. INCUBATION DES CML A LONG TERME DANS LE GLUCOSE (FIG. 45)

2.1 Etat contractile

L'addition de glucose (15mM) au milieu d'incubation durant 4 passages est suivie d'une augmentation très significative de la synthèse globale de protéines par rapport à l'état basal (X 1,9 pour R.n ; X 4,4 pour P.o) et à l'incubation de 48h (X 1,6 Pour le R.n ; X 3,1 pour P.o). Elle est également plus élevée dans les CMLc de P.o que dans celles de R.n (X 2 et $p < 0,0001$).

Par ailleurs, l'incorporation de proline tritiée apparaît à ce stade significativement plus élevée dans le CEC que dans le CIC ($p < 0,01$) pour les deux espèces étudiées.

2.2 Etat synthétique

Par rapport à l'état basal, la synthèse des protéines totales est augmentée respectivement dans les CMLs de R.n et de P.o de 157% et 162%. Par rapport à l'incubation de 48h, elle s'élève de 110% dans les CMLs de R.n et 105% dans les CMLs de P.o.

Comme pour l'état contractile, la synthèse protéique globale est statistiquement plus élevée dans les CMLs de P.o que dans les CMLs de R.n ($p < 0,001$).

La détermination de la radioactivité dans les différents compartiments montre une augmentation très significative de l'incorporation de proline tritiée ($p < 0,0001$). Toutefois, il apparaît que dans les CMLs de R.n, cette incorporation est significativement plus élevée dans

le CEC que dans le CIC ($p < 0,01$) alors que dans les CMLs de P.o, nous relevons une différence non significative entre les 2 compartiments.

La présence de glucose dans le milieu d'incubation à court terme et long terme s'accompagne d' une augmentation notable de la sécrétion notamment à l'état S de l'incubation à long terme où nous enregistrons respectivement dans les CML de R.n et de P.o, 44,3 ±1,7 et 55,8 ± 3,8 % (Fig. 59).

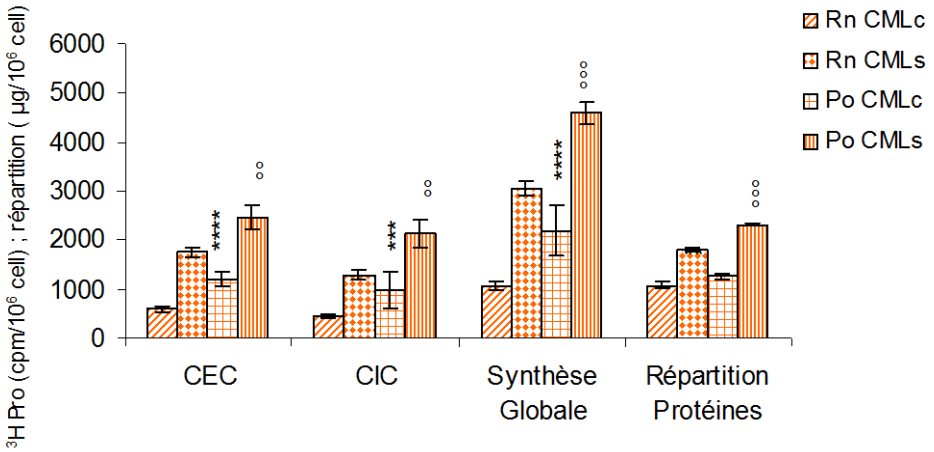


Figure 45 - Effets de concentrations élevées de glucose (15 mM) durant 4 passages sur l'incorporation de ^{3}H Pro dans les protéines totales des CML de P.o et R.n en culture secondaire aux phénotypes C et S.

Les valeurs sont les moyennes ± l'écart type de six déterminations.
L'analyse statistique entre état C et S a révélé des différences très significatives pour les deux espèces ($p < 0.001$ à 0.0001).
(*) Etat C des CML de P.o ***vs*** état C des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o ***vs*** état S des CML de R.n
L'analyse statistique entre état C et S a révélé des différences très significatives pour les deux espèces ($p < 0.0001$) à l'exception du CIC des CML de R.n où la différence n'est pas significative.

C. EFFET DES DIABETES NID ET ID (FIG. 46)

A cet état pathologique, nous assistons à une synthèse exagérée des protéines totales au phénotype synthétique des deux espèces soit : X 5,6 dans les CMLs de R.n et X 4,5 dans les CMLs de P.o. Le phénotype contractile est également marqué par une augmentation très sensible de la synthèse protéique.

Les CML de R.n et P.o diabétiques évoluent de façon comparable dans ce processus de synthèse exagérée toutefois et quoique peu significatives, les différences statistiques relevées entre les cellules des deux espèces restent en faveur des CMLs de P.o ($p < 0,05$).

L'incorporation de la proline tritiée augmente très significativement dans les compartiments extra et intracellulaires des CML des R.n et de P.o diabétiques.

Elle est équivalente dans les deux compartiments des CML de R.n aux phénotypes C et S. Elle est au contraire plus élevée dans le CEC des CML de P.o ; les différences statistiques sont peu significatives à l'état contractile ($p < 0,05$) et significatives à l'état synthétique ($p < 0,001$).

Pour les CMLs de R.n et de P.o diabétiques, l'augmentation de la sécrétion des protéines est très hautement significative comparativement à l'état basal (Fig. 49) ; elle atteint des taux respectifs de 79,1 ± 7,3 % et 85,9 ± 1,2 %. Statistiquement, les différences interspécifiques sont peu significatives ($p < 0,05$).

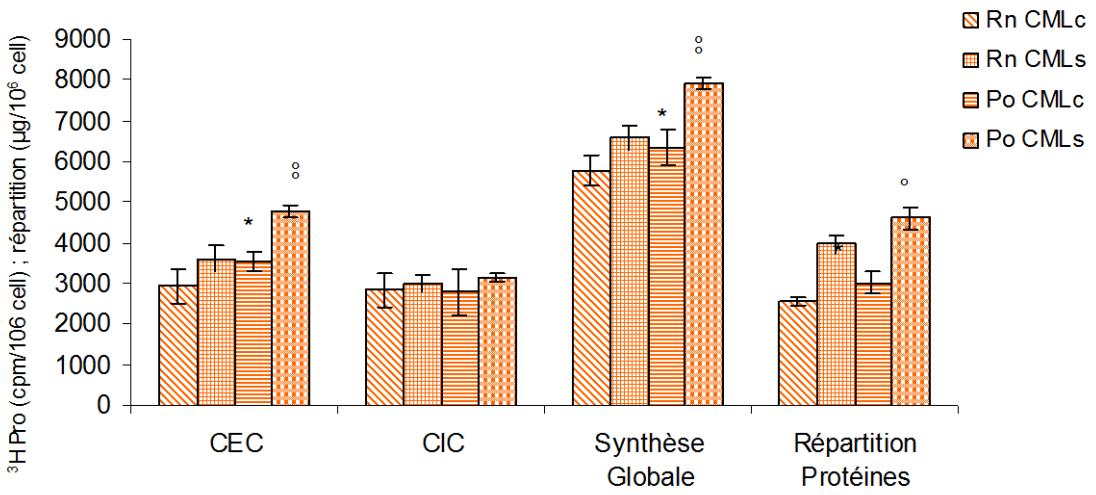


Figure 46 - Incorporation de ^{3}H Pro dans les protéines totales des CML en culture secondaire de R.n et P.o diabétiques, aux phénotypes C et S.

Les valeurs sont les moyennes de six déterminations affectées de l'écart type

L'analyse statistique entre état C et S a révélé des différences significatives pour les deux espèces ($p < 0.01$) à l'exception du CIC où les différences ne sont pas significatives

(*) Etat C des CML de P.o ***vs*** état C des CML de R.n

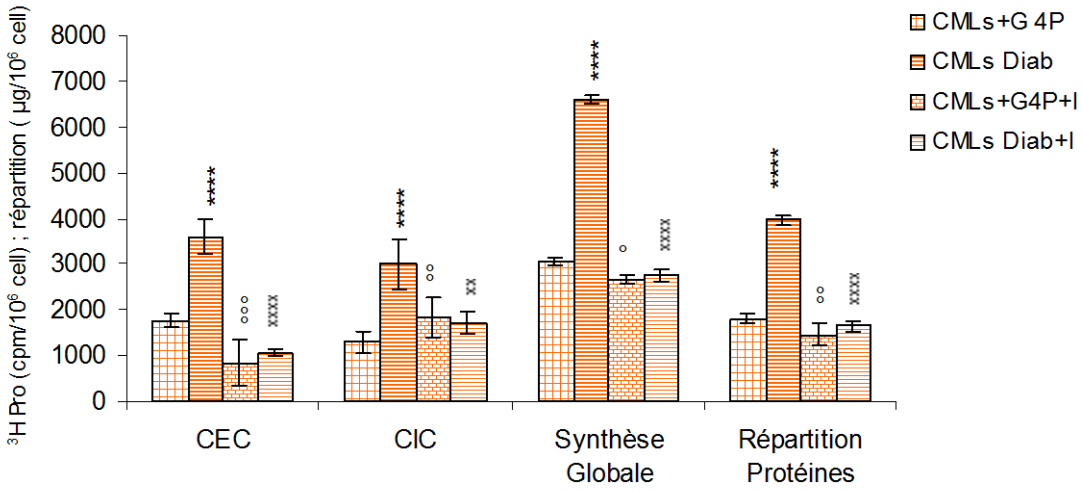
(°) Etat S des CML de P.o ***vs*** état S des CML de R.n

D. INFLUENCE DE L'INSULINE (FIG. 47, 48)

Les CMLs de R.n et de P.o incubées à long terme dans un milieu enrichi en glucose ainsi que les CMLs de R.n et de P.o diabétiques soumises à l'action de l'insuline pendant 48h présentent une diminution des synthèses protéiques totales et les pourcentages respectifs correspondants à cette baisse de synthèse protéique sont de 12,4%, 40,0%, 55,8% et 62,6%.

L'incorporation de la proline tritiée diminue très sensiblement dans le CEC comme dans le CIC et les différences enregistrées sont très significatives par rapport aux témoins correspondants. Toutefois, la radioactivité demeure plus élevée que dans les CML des témoins normaux.

En définitive, après l'action de l'insuline durant 48h, nous relevons donc une diminution de la synthèse des protéines qui explique la baisse très sensible de la sécrétion protéique alors observée (Fig. 59). Les taux de diminution correspondants respectivement aux CMLs de R.n et P.o incubées à long terme dans un milieu enrichi en glucose ainsi qu'aux CMLs de R.n et P.o diabétiques sont de 54,0%, 54,6%, 41,0% et 45,8%.



47 - Influence de l'insuline à 4 mU/ml pendant 48h sur la biosynthèse des protéines totales dans les CML de R.n en culture secondaire incubées durant 4P dans un milieu enrichi en glucose et celles provenant de R.n diabétique, au phénotype S.

Les valeurs sont les moyennes ± l'écart type de six déterminations
(*) Effets du glucose durant 4P ***vs*** état Diab
(°) Influence de l'insuline ***vs*** témoins correspondants
(x) Influence de l'insuline ***vs*** témoins normaux

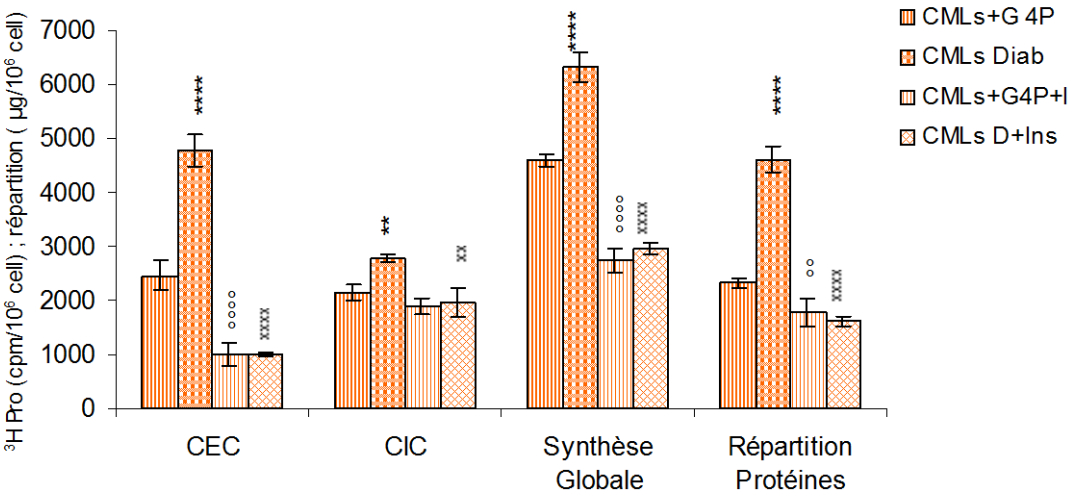


Figure 48 - Influence de l'insuline à 4 mU/ml pendant 48h sur la biosynthèse des protéines totales dans les CML de P.o en culture secondaire incubées durant 4P dans un milieu enrichi en glucose et celles provenant de P.o diabétique, au phénotype S.

Les valeurs sont les moyennes ± l'écart type de six déterminations
(*) Effets du glucose durant 4P ***vs*** état Diab
(°) Influence de l'insuline ***vs*** témoins correspondants
(x) Influence de l'insuline ***vs*** témoins normaux

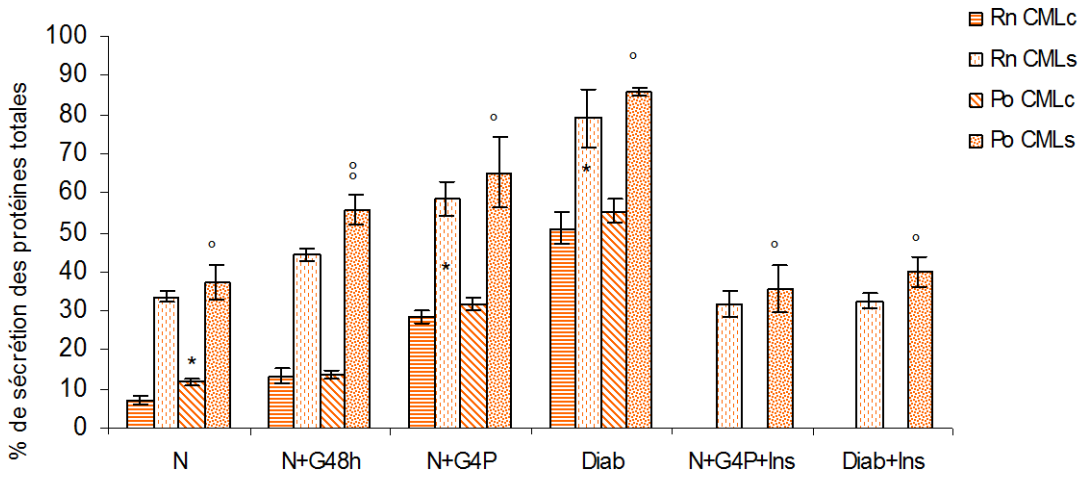


Figure 49 - Sécrétion des protéines par les CML de R.n et P.o en culture secondaire au phénotypes C et S dans les différentes conditions expérimentales étudiées.

Les valeurs sont les moyennes de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Etat C des CML de P.o dans les différentes conditions expérimentales ***vs*** états C correspondants des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o dans les différentes conditions expérimentales ***vs*** états S correspondants des CML de R.n
L'analyse statistique entre phénotypes C et S a révélé des différences très significatives pour les deux espèces ($P < 0.0001$) .

E. CONCLUSION (FIG. 50, 51, 52)

- **A l'état contractile basal, les protéines totales sont plus importantes dans le CIC particulièrement chez R.n**
- **A l'état synthétique, elles prédominent dans le CEC pour les CML des deux espèces étudiées, R.n et P.o.**
- **Le glucose à long terme et l'état diabétique s'accompagnent d'une synthèse accrue et d'une concentration importante des protéines dans les CIC. Cette exagération de synthèse protéique est suivie d'une sécrétion et d'une accumulation aussi importante dans les CEC.**
- **Après action de l'insuline, le taux d'incorporation de proline tritiée est très significativement diminué dans le CEC. Cependant, les résultats sont moins spectaculaires dans les CIC. L'accumulation intracellulaire des protéines s'expliquerait par la diminution du taux de sécrétion qui se rapproche des taux de l'état basal.**
- **L'effet de l'insuline est spectaculaire, néanmoins les valeurs obtenues restent plus élevées que celles des témoins.**

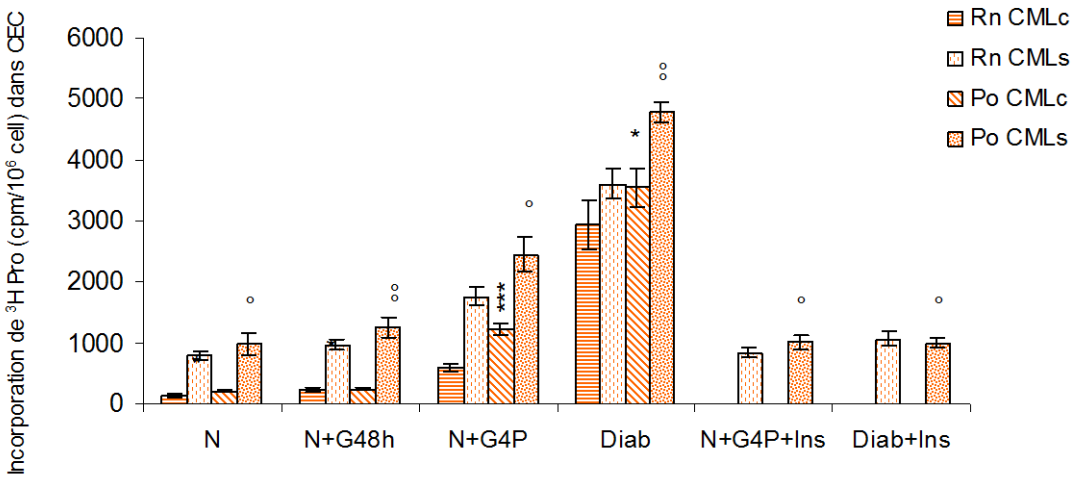


Figure 50 - Incorporation de ^{3}H Pro dans les protéines totales du CEC des CML de R.n et P.o en culture secondaire aux phénotype C et S dans les différentes conditions expérimentales étudiées.

Les valeurs sont les moyennes de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Etat C des CML de P.o dans les différentes conditions expérimentales ***vs*** états C correspondants des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o dans les différentes conditions expérimentales ***vs*** états S correspondants des CML de R.n
L'analyse statistique entre phénotypes C et S a révélé des différences de peu significatives à très significatives pour les CML des deux espèces (P < 0.001).

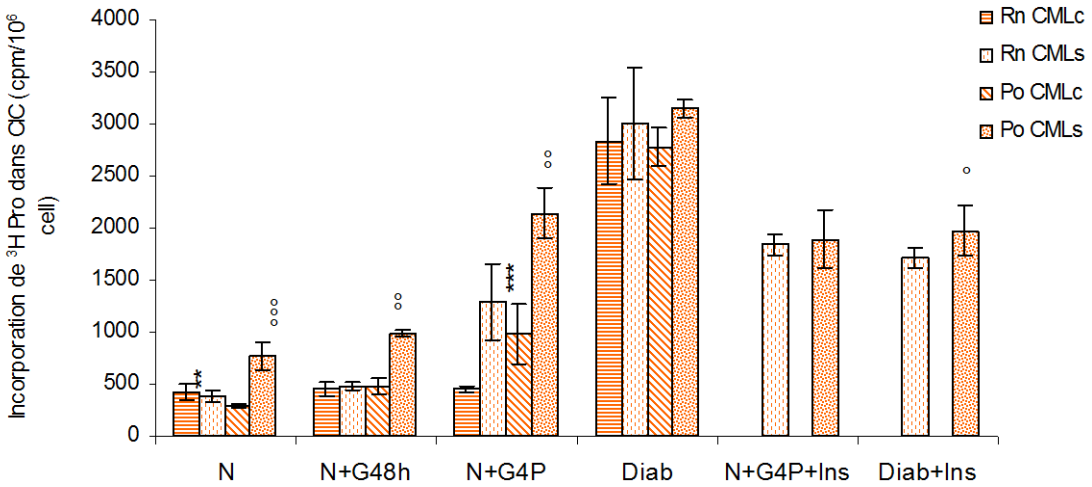


Figure 51 - Incorporation de ^{3}H Pro dans les protéines totales du CIC des CML de R.n et P.o en culture secondaire dans différentes conditions expérimentales étudiées aux phénotypes C et S.

Les valeurs sont les moyennes de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Etat C des CML de P.o dans les différentes conditions expérimentales ***vs*** états C correspondants des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o dans les différentes conditions expérimentales ***vs*** états S correspondants des CML de R.n
L'analyse statistique entre phénotypes C et S a révélé des différences NS à peu significatives pour les CML de R.n sauf après incubation au glucose de 4P où P < 0.0001 ; statistiquement significatives pour les CML de P.o (P < 0.01 à 0.001) sauf à l'état du diabète où P est NS.

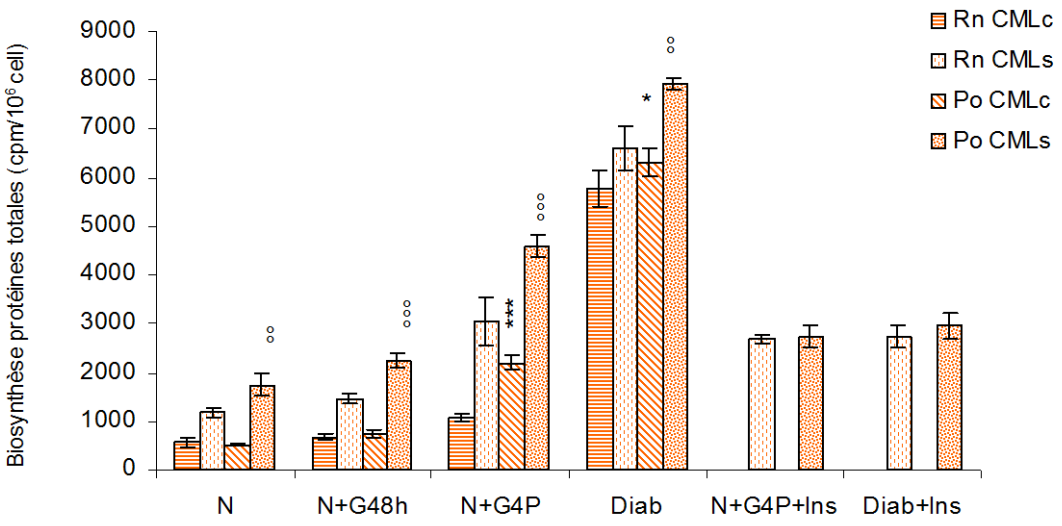


Figure 52 - Biosynthèse globale des protéines totales correspondant à l'incorporation de ^{3}H Pro dans les deux compartiments (Milieu et cellules) des CML de R.n et P.o en culture secondaire dans différentes conditions expérimentales étudiées.

Les valeurs sont les moyennes de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Etat C des CML de P.o dans les différentes conditions expérimentales ***vs*** états C correspondants des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o dans les différentes conditions expérimentales ***vs*** états S correspondants des CML de R.n
L'analyse statistique entre phénotypes C et S a révélé des différences très significatives pour les deux espèces ($P < 0.001$ à 0.0001)

II. BIOSYNTHESE DES COLLAGENES TOTAUX (Tab. XII, XIII)

Le collagène peut être considéré comme un bon marqueur de la MEC car il correspond à l'une des macromolécules les plus fortement impliquées dans le processus athéroscléreux.

Les CML sont incubées 24h en présence de proline tritiée (^{3}H Pro) et la biosynthèse des collagènes, exprimée en cpm/10^6 cellules, est déterminée par l'incorporation de proline tritiée dans la fraction protéique pepsino-résistante contenue dans les deux compartiments.

Le taux de synthèse est exprimé par le rapport de la radioactivité pepsino-résistante ramenée à la radioactivité totale contenue dans les protéines.

Le pourcentage de sécrétion du collagène synthétisé par les CML est déterminé par le rapport de la radioactivité totale contenue dans le milieu sur la radioactivité totale contenue dans les deux compartiments extra- et intracellulaires.

A. ETAT BASAL (FIG. 53, 54)

Pour les deux phénotypes, contractile et synthétique, l'incorporation de proline tritiée est significativement plus importante dans le CEC que dans le CIC.

A l'état contractile, le radiomarquage évalué dans les compartiments extra- et intracellulaire des CML de R.n et de P.o, indique des variations non significatives. IL correspond respectivement à 161 ± 29 et 159 ± 3 cpm/10^6 cellules dans le CEC ; 59 ±15 et 51 ± 5 cpm/10^6 cellules dans le CIC.

La sécrétion du collagène est significativement plus élevée dans les CMLc de R.n (21,3 ± 0,6% *vs* 16,5 ± 0,8% dans les CMLc de P.o).

A l'état synthétique, l'incorporation de la proline tritiée dans les CML de P.o est significativement plus élevée dans les CEC et CIC comparativement aux CML de R.n ($p < 0,01$). Il en résulte un taux de collagène supérieur dans les CMLs de P.o mais la différence statistique est peu significative : 39,5 ± 0,8% *vs* 27,3 ± 1,5 % ($p < 0,02$).

La sécrétion de collagène est également plus élevée dans les CML de P.o ($p < 0,05$).

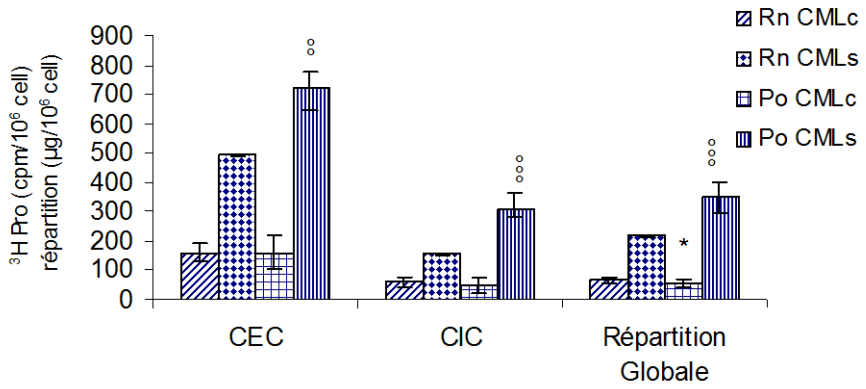


Figure 53 - Biosynthèse et répartition des collagènes totaux dans les CML aortiques de R.n et P.o en culture secondaire aux phénotypes C et S de l'état basal.

La biosynthèse des collagènes totaux est exprimée en cpm/10^6 cellules.
La répartition des protéines totales déterminée par la méthode de Bradford (1976) est exprimée en µg/10^6 cellules.
Les valeurs correspondent à la moyenne de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Etat C des CML de P.o vs état C des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o vs état S des CML de R.n
L'analyse statistique entre état C et S a révélé des différences très significatives dans les deux compartiments et pour les deux espèces ($p < 0.0001$)

TABLEAU XII

INCORPORATION DE ^{3}H PRO DANS LES COLLAGENES CONTENUS DANS LES CEC ET CIC DES CML DE R.n ET P.o EN CULTURE DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES (cpm/10^6 cellules)

R.n

	Etat	CEC (cpm/10^6 cellules)		CIC (cpm/10^6 cellules)	
N	C	161 ± 29		59 ± 15	+++
	S	493 ± 59		156 ± 27	++++
N+G48h	C	305 ± 32	°°°	158 ± 18	°°° +++
	S	614 ± 82	*	369 ± 70	*** +++
N+G4P	C	625 ± 74	°°°°	416 ± 34	°°°° +++
	S	1419 ± 142	****	856 ± 134	**** ++++
Diab	C	2244 ± 308	°°°°	1717 ± 91	°°°° +
	S	3498 ± 307	****	2033 ± 278	*** ++++
N+G4P+Ins	S	556 ± 62	¤¤¤¤ x	738 ± 115	xxxx ++
Diab+Ins	S	826 ± 76	¤¤¤¤ xxx	873 ± 99	¤¤¤ xxxx

P.o

	Etat	CEC (cpm/10^6 cellules)		CIC (cpm/10^6 cellules)	
N	C	159 ± 3		51 ± 5	++++
	S	720 ± 72		311 ± 26	++++
N+G48h	C	366 ± 34	°°°	178 ± 16	°°° +++
	S	659 ± 55		639 ± 83	***
N+G4P	C	1027 ± 197	°°°°	765 ± 108	°°°° +
	S	1973 ± 154	****	1306 ± 308	**** ++
Diab	C	2873 ± 279	°°°°	2199 ± 62	°°°° ++
	S	4060 ± 160	****	2892 ± 242	*** +++
N+G4P+Ins	S	899 ± 65	¤¤¤¤ xx	1128 ± 115	xxxx ++
Diab+Ins	S	1197 ± 61	¤¤¤¤ xxxx	1179 ± 114	¤¤¤¤ xxxx

L'incorporation dans le collagène total exprimée en cpm/10^o cellules est déterminée par le rapport : radioactivité pepsino - résistante / radioactivité totale des protéines incorporée dans les deux compartiments (milieu + cellules)

Les valeurs sont les moyennes ± l'écart type de six déterminations

(°) Etat C de Diab ***vs*** état C + G 4P ***vs*** état C + G 48h ***vs*** état basal C

(*) Etat S de Diab ***vs*** état S + G 4P ***vs*** état S + G 48h ***vs*** état basal S

(¤) influence de l'insuline ***vs*** témoins correspondants

(x) influence de l'insuline ***vs*** état synthétique basal

(+) compartiment extracellulaire (CEC) ***vs*** compartiment intracellulaire (CIC)

TABLEAU XIII

TAUX DE SYNTHESE ET DE SECRETION DES COLLAGENES TOTAUX PAR LES CML DE R.n ET P.o EN CULTURE, DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES

R.n

	Etat	Taux collagène total (%)		Taux sécrétion (%)	
N	C	10,6 ± 1,1		21,3 ± 0,6	
	S	27,3 ± 1,5		38,1 ± 1,5	
N+G48h	C	27,3 ± 2,1	°°°	26,5 ± 1,2	°°
	S	45,4 ± 4,4	***	41,3 ± 4,2	*
N+G4P	C	49,4 ± 4,6	°°°	30,2 ± 1,3	°°
	S	75,3 ± 5,4	****	62,6 ± 2,6	****
Diab	C	68,9 ± 1,8	°°	56,4 ± 5,1	°°°
	S	115,5 ± 7,1	****	87,9 ± 4,1	***
N+G4P+Ins	S	48,7 ± 6,2	¤¤¤ xxx	43,0 ± 2,8	¤¤ xx
Diab+Ins	S	77,7 ± 5,7	¤¤¤¤ xxxx	54,9 ± 4,3	¤¤¤¤ xxx

P.o

	Etat	Taux collagène total (%)		Taux sécrétion (%)	
N	C	12,6 ± 0,7		16,5 ± 0,8	
	S	39,5 ± 3,3		46,6 ± 1,8	
N+G48h	C	30,0 ± 3,6	°°°°	27,1 ± 1,0	°°°°
	S	58,4 ± 4,3	***	50,6 ± 5,0	*
N+G4P	C	51,8 ± 2,2	°°°	34,3 ± 2,0	°°
	S	113,0 ± 8,3	****	86,9 ± 5,7	****
Diab	C	81,5 ± 3,5	°°	57,5 ± 1,5	°°
	S	148,5 ± 3,6	***	87,0 ± 5,0	
N+G4P+Ins	S	73,2 ± 10,6	¤¤ xxxx	46,2 ± 4,9	¤¤¤¤
Diab+Ins	S	79,7 ± 5,8	¤¤¤¤ xxxx	44,6 ± 8,5	¤¤¤

Le taux de collagène total est éterminé selon le rapport : radioactivité totale (contenue dans le milieu et les cellules) après pepsination / radioactivité totale avant pepsination
La sécrétion globale du collagène est exprimée par le rapport de la radioactivité incorporée dans le milieu ramenée à la radioactivité totale ccontenue dans les deux compartiments
Les valeurs sont représentées par les moyennes de six déterminations ± l'écart type
(°) Etat C de Diab ***vs*** état C + G 4P ***vs*** état C + G 48h ***vs*** état basal C
(*) Etat S de Diab ***vs*** état S + G 4P ***vs*** état S + G 48h ***vs*** état basal S
(¤) influence de l'insuline ***vs*** témoins correspondants
(x) influence de l'insuline ***vs*** état synthétique basal

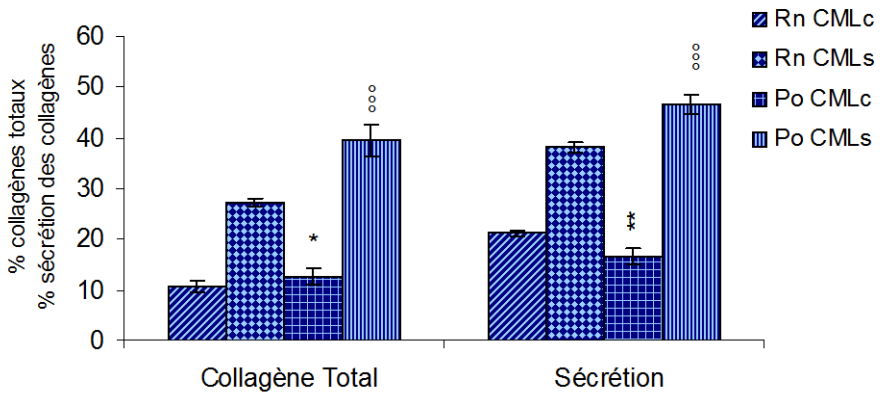


Figure 54 - Taux des collagènes totaux et taux de leur sécrétion dans les CML aortiques de R.n et P.o en culture secondaire aux phénotypes C et S de l'état basal.
Le taux de synthèse de collagène correspond au rapport : radioactivité pepsino-résistante / radioactivité totale contenue dans les protéines.
La proportion de sécrétion correspond au rapport : radioactivité contenue dans le milieu / radioactivité contenue dans les 2 compartiments (CEC + CIC).
Les valeurs correspondent à la moyenne de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Etat C des CML de P.o vs état C des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o vs état S des CML de R.n
L'analyse statistique entre état C et S a révélé des différences très significatives pour les deux espèces ($p < 0.0001$)

B. EFFET D'UNE INCUBATION AU GLUCOSE A COURT ET LONG TERME

1. INCUBATION PENDANT 48H (FIG. 55, 56)

1.1. Etat contractile

Après une incubation de 48h dans un milieu enrichi en glucose, l'incorporation de proline tritiée dans les collagènes augmente significativement dans les deux compartiments ($P < 0,001$). Elle demeure toutefois plus élevée dans le CEC (X1,9 pour R.n ; X 2,06 pour P.o). Par ailleurs, les différences statistiques enregistrées entre les compartiments respectifs des CML de R.n et de P.o ne sont pas significatives.

Les taux de collagène nouvellement synthétisés sont estimés à 27,3 ± 2,1 % dans la CML de R.n et 30,0 ± 3,6 % dans la CML de P.o expliquant l'augmentation des taux de sécrétion des collagènes par les CML des deux espèces.

Les différences interspécifiques relevées pour les taux de collagène et leur sécrétion sont comparables entre les deux espèces (p : NS).

2.2. Etat synthétique

La présence de glucose dans le milieu d'incubation induit à cet état diverses modifications au phénotype synthétique :

- La mesure de l'incorporation de la proline tritiée varie très significativement notamment dans les cellules ($p < 0,0001$).

- elle est statistiquement plus élevée dans le CEC que dans le CIC des CML de R.n (614 ± 82 *vs* 369 ± 70 cpm/10^6 cellules) et varie peu entre les 2 compartiments des CML de P.o (659 ± 5 *vs* 639 ± 83 cpm/ cellules).

- La comparaison interspécifique montre peu de variations entre les CEC (614 ± 82 cpm/10^6 cellules dans les CML de R.n *vs* 659 ± 55 cpm/10^6 cellules dans les CML de P.o). En

revanche, elle est statistiquement plus élevée dans le CIC des CMLs de P.o ($p < 0,0001$). Le taux des collagènes est alors plus élevé dans les CML de P.o (58,4 ± 4,3% *vs* 41,3 ± 4,2 %) de même que sa proportion de sécrétion ($p < 0,0001$).

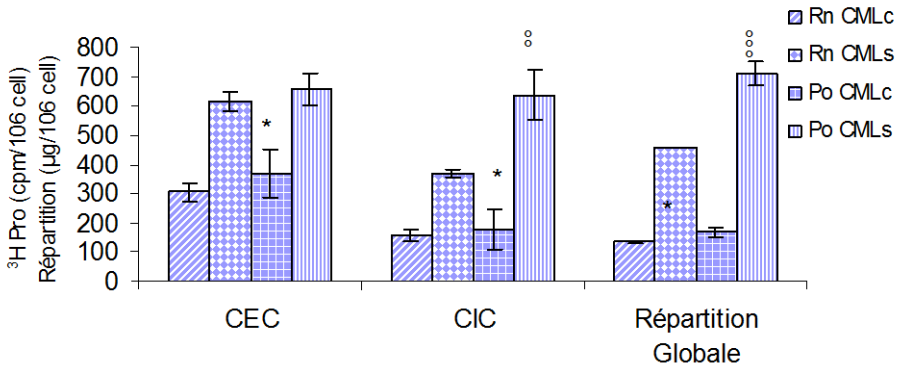


Figure 55 - Effet de concentrations élevées de glucose (15 mM) pendant 48h sur la biosynthèse et la répartition des collagènes dans les CML aortiques de R.n et P.o en culture secondaire aux phénotypes C et S.

La biosynthèse des collagènes totaux est exprimée en cpm/10^6 cellules.
La répartition des protéines totales déterminée par la méthode de Bradford (1976) est exprimée en µg/10^6 cellules.
Les valeurs correspondent à la moyenne de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Etat C des CML de P.o vs état C des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o vs état S des CML de R.n
L'analyse statistique entre état C et S a révélé des différences très significatives dans les CEC et CIC pour les deux espèces.

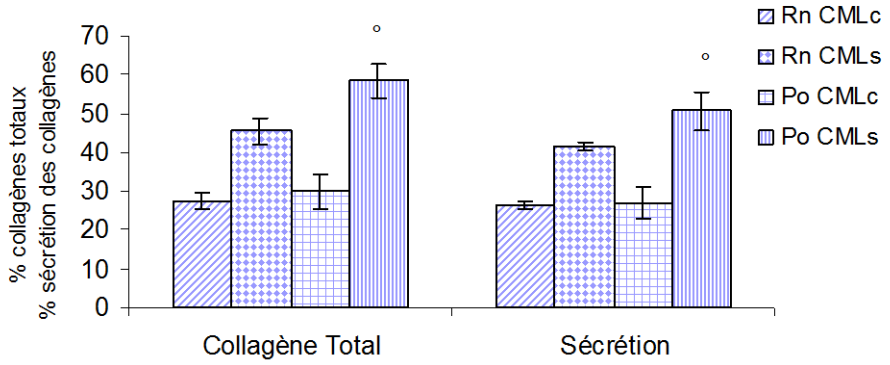


Figure 56 - Effet de concentrations élevées de glucose (15 mM) pendant 48h sur les taux de collagène et les taux de leur sécrétion dans les CML de R.n et P.o en culture secondaire aux phénotypes C et S.

Les valeurs correspondent à la moyenne de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Etat C des CML de P.o vs état C des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o vs état S des CML de R.n
L'analyse statistique entre état C et S a révélé des différences significatives pour les CML de R. n ($p < 0.01$) et très significatives pour les CML de P.o ($p < 0.001$).

2. INFLUENCE DU GLUCOSE A LONG TERME (FIG. 57, 58)

2.1. Etat contractile

La mesure de l'incorporation du pool de proline tritiée indique une augmentation du taux de synthèse des collagènes estimés à 49,4 ± 4,6 % dans les CML de R.n et 51,8 ± 2,2 % dans les CML de P.o). L'étude statistique révèle une différence peu significative entre les deux espèces.

Par rapport à l'incubation de 48h, la proline tritiée incorporée augmente significativement dans chaque compartiment ($p < 0,0001$).

Elle est plus élevée dans les CEC que dans le CIC (x 1,5 pour les CML de R.n et x 1,3 pour les CML de P.o). L'analyse statistique interspécifique a enregistré des différences significatives entre les milieux et cellules respectifs ($p < 0,01$).

١,٢. *Etat synthétique*

Après une incubation de 4P dans un milieu enrichi en glucose, les taux de collagènes totaux atteignent 113 ± 8.3 % dans les CMLs de P.o contre 75.3 ± 5.4 % dans les CMLs de R.n ($p < 0.001$).

Par rapport à l'état basal et à l'incubation au glucose pendant 48h, la mesure de l'incorporation de la proline tritiée augmente très significativement dans les deux compartiments avec cependant une exagération de collagène dans le CEC (X1.7 pour le R.n ; X 1,9 pour le P.o).

A l'effet du glucose, les CMLs de P.o se révèlent plus sensibles que celles de R.n puisque l'analyse statistique a révélé des différences significatives entre les CEC ($p < 0,01$) et peu significative entre les CIC ($p < 0,02$).

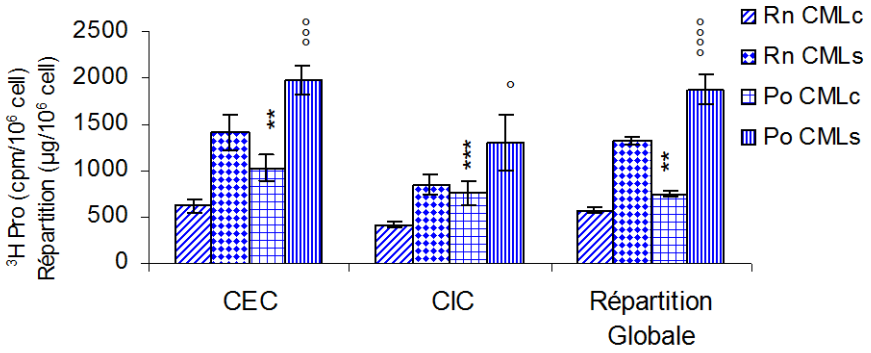


Figure 57 - Effet de concentrations élevées de glucose (15mM) durant 4P sur la biosynthèse et la répartition des collagènes dans les CML de R.n et P.o en culture secondaire aux phénotypes C et S.

La biosynthèse des collagènes totaux est exprimée en cpm/10^6 cellules.
La répartition des protéines totales déterminée par la méthode de Bradford (1976) est exprimée en µg/10^6 cellules.
Les valeurs correspondent à la moyenne de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Etat C des CML de P.o vs état C des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o vs état S des CML de R.n
L'analyse statistique entre état C et S a révélé des différences très significatives dans les deux compartiments et pour les deux espèces ($p < 0.001$ à 0.0001).

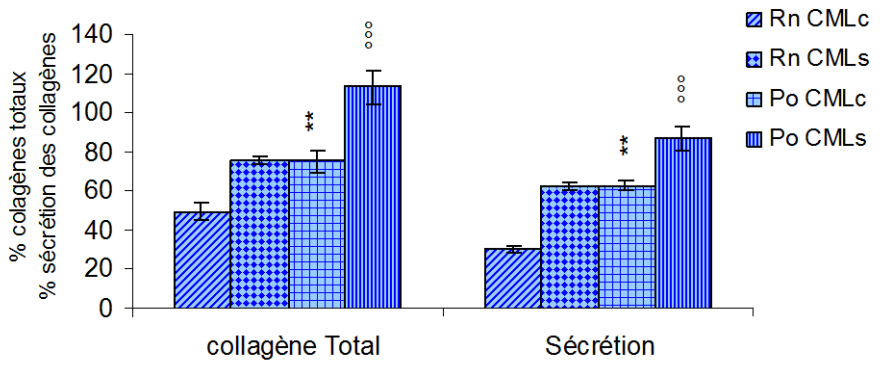


Figure 58 - Effet du glucose (15 mM) durant 4P sur les taux de collagène et les taux de leur sécrétion dans les CML de R.n et P.o en culture secondaire aux phénotypes C et S.
Les valeurs correspondent à la moyenne de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Etat C des CML de P.o vs état C des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o vs état S des CML de R.n
L'analyse statistique entre état C et S a révélé des différences significatives pour les deux espèces ($p < 0.01$).

C. EFFET DES DIABETES NID ET ID (FIG. 59, 60)

Les CML provenant de R.n DID et P.o DNID montrent des taux de synthèse des collagènes totaux très élevés par rapport aux conditions d'expérience précédentes.

A l'état contractile, ces taux estimés dans les CML de R.n et de P.o sont de 68,9 ±1,8 % et 81,5 ± 3,5 % ($p < 0,01$). A l'état synthétique, ils atteignent 115,5 ±7,1 % dans les CMLs de R.n et 148,5 ±10,3 % dans les CMLs de P.o ($p < 0,001$).

Les CML contractiles et synthétiques présentent donc une incorporation de proline tritiée exagérée par rapport à l'état basal. Par ailleurs, cette forte synthèse marque plus les CML synthétiques notamment celles de P.o Pour lesquelles nous avons enregistré 4060 ± 160 cpm/10^6 cellules dans le milieu et 2892 ± 62 cpm /10^6 cellules dans le CIC.

Nous notons également une prédominance de collagène dans le CEC/CIC, statistiquement significative en particulier dans les CMLs ($p < 0,001$).

Les comparaisons interspécifiques montrent des différences significatives entre les compartiments respectifs des CML des deux espèces ($p < 0,001$ à l'état C ; $p < 0,01$ à l'état S).

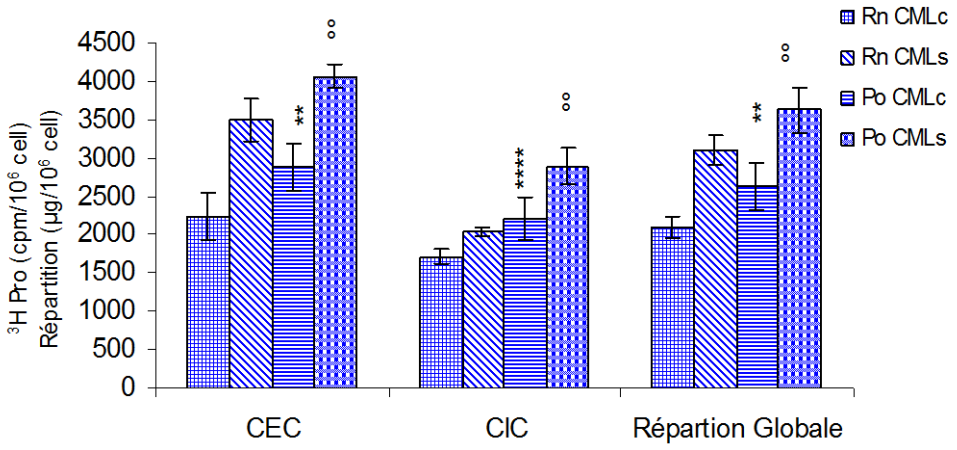


Figure 59 - Incorporation de ^{3}H Pro dans les collagènes et leur répartition dans les CML de R.n et P.o diabétiques en culture secondaire, aux phénotypes C et S.

La biosynthèse des collagènes totaux est exprimée en cpm/10^6 cellules.
La répartition des protéines totales déterminée par la méthode de Bradford (1976) est exprimée en µg/10^6 cellules.
Les valeurs correspondent à la moyenne de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Etat C des CML de P.o vs état C des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o vs état S des CML de R.n
L'analyse statistique entre états C et S a révélé pour les deux espèces des différences significatives pour les CEC (0.01) et peu significatives pour les CIC ($p < 0.05$).

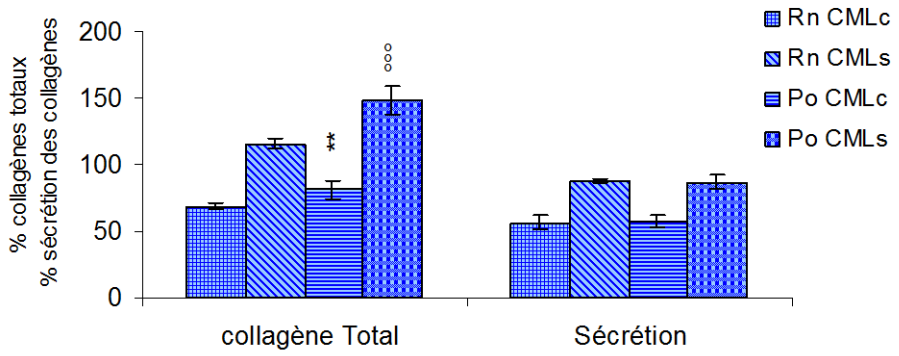


Figure 60 - Taux des collagènes et taux de leur sécrétion dans les CML de R.n et P.o diabétiques en culture secondaire aux phénotypes C et S.

Les valeurs correspondent à la moyenne de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Etat C des CML de P.o vs état C des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o vs état S des CML de R.n
L'analyse statistique entre état C et S a révélé pour les deux espèces des différences statistiquement significatives ($p < 0.001$).

D. INFLUENCE DE L'INSULINE (FIG. 61, 62, 63, 64)

La présence de l'insuline dans le milieu de culture de CMLs incubées à long terme dans du glucose et des CMLs de diabétiques est suivie d'une diminution très sensible de la radioactivité contenue dans les collagènes totaux à l'exception des CIC des CML incubées à long terme de R.n et P.o où la diminution ne montre pas de différences significatives par rapport aux témoins correspondants (738 ± 115 contre 856 ± 134 cpm/10^6 cellules pour les CMLs de R.n et 1128 ± 115 contre 1306 ± 308 cpm/10^6 cellules pour les CML de P.o).

Ainsi, dans les CMLs de R.n incubées en présence de glucose à long terme et celles provenant de R.n diabétique, la mesure de l'incorporation de proline tritiée contenue dans

les collagènes totaux des CEC et CIC équivaut respectivement à 556 ± 62 et 738 ± 115 cpm/10^6 cellules ($p < 0,01$) ; 826 ± 76 et 873 ± 99 cpm/10^6 cellules (p : NS).

Dans les CMLs de P.o incubées pendant 4P et celles de P.o diabétique, l'incorporation de proline tritiée dans les collagènes totaux indique respectivement : 899 ± 65 et 1128 ± 115 cpm/10^6 cellules dans les CMLs incubées ($p < 0,05$) ; 1197 ± 61 et 1179 ±114 cpm/10^6 cellules dans les CMLs de P.o diabétique (p : NS).

Toutefois, comme pour les protéines totales, le retour à l'état basal n'est pas observé. En effet, malgré la sensible diminution de biosynthèse des collagènes totaux, les différences restent statistiquement très significatives par rapport aux témoins normaux ($p < 0,001$ à $p < 0,0001$).

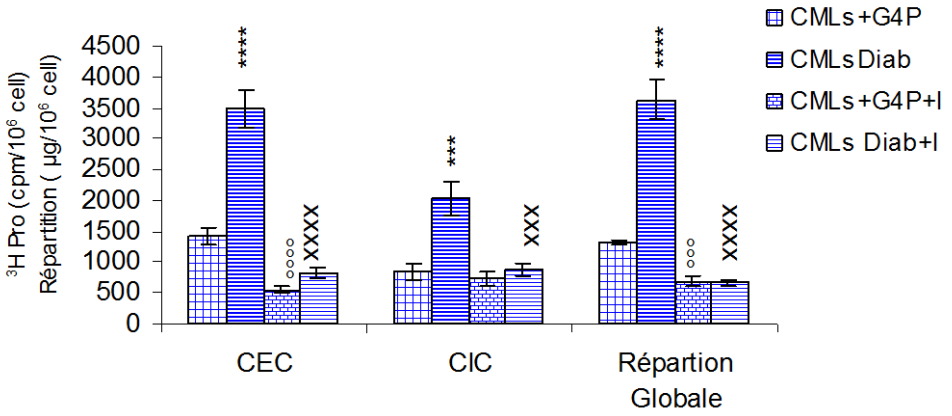


Figure 61 - Influence de l'insuline à 4 mU/ml pendant 48h sur la biosynthèse des collagènes dans les CML de R.n en culture secondaire incubées durant 4P dans du glucose 15 mM et celles provenant de R.n diabétique.

La biosynthèse des collagènes totaux est exprimée en cpm/10^6 cellules.
La répartition des protéines totales déterminée par la méthode de Bradford (1976) est exprimée en µg/10^6 cellules.
Les valeurs sont les moyennes ± l'écart type de six déterminations
(*) Effets du glucose durant 4P vs état Diab dans le milieu (CEC) et dans les cellules (CIC)
(°) Influence de l'insuline vs témoins correspondants
(x) Influence de l'insuline vs témoins normaux

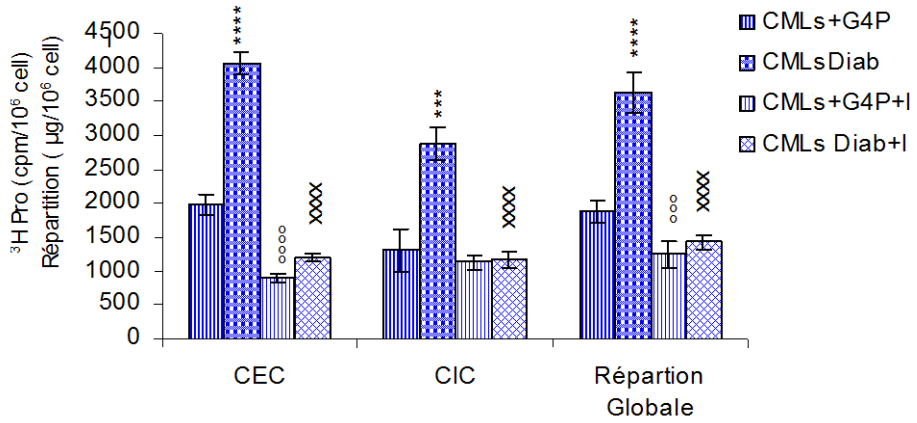


Figure 62 - Influence de l'insuline à 4 mU/ml pendant 48h sur la biosynthèse des collagènes dans les CML de P.o en culture secondaire incubées durant 4P dans un milieu enrichi en glucose (15 mM) et celles provenant de P.o diabétique.

La biosynthèse des collagènes totaux est exprimée en cpm/10^6 cellules.
La répartition des protéines totales déterminée par la méthode de Bradford (1976) est exprimée en µg/10^6 cellules.
Les valeurs sont les moyennes ± l'écart type de six déterminations
(*) Effets du glucose durant 4P vs état Diab dans le milieu (CEC) et dans les cellules (CIC)
(°) Influence de l'insuline vs témoins correspondants
(x) Influence de l'insuline vs témoins normaux

Les taux de collagènes totaux diminuent très significativement en rapport avec la mesure de l'incorporation de proline tritiée. Les diminutions enregistrées respectivement dans les CMLs de R.n incubées et celles de R.n diabétique sont de 35,3 % et 32,7 %. Dans les CMLs de P.o, cette diminution est également remarquable puisqu'elle est de 35% dans les CMLs incubées pendant 4 P et 37% dans les CMLs de diabétiques.

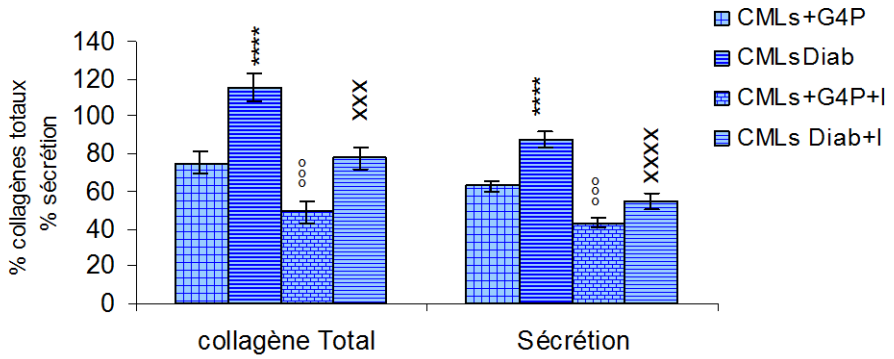


Figure 63 - Influence de l'insuline à 4 mU/ml pendant 48h sur les taux de collagènes et leur taux de sécrétion dans les CML aortiques de R.n en culture secondaire incubées durant 4P dans un milieu enrichi en glucose (15 mM) et celles provenant de R.n diabétique, au phénotype S.

Les valeurs sont les moyennes ± l'écart type de six déterminations
(*) Effets du glucose durant 4P vs état Diab
(°) Influence de l'insuline vs témoins correspondants
(x) Influence de l'insuline vs témoins normaux

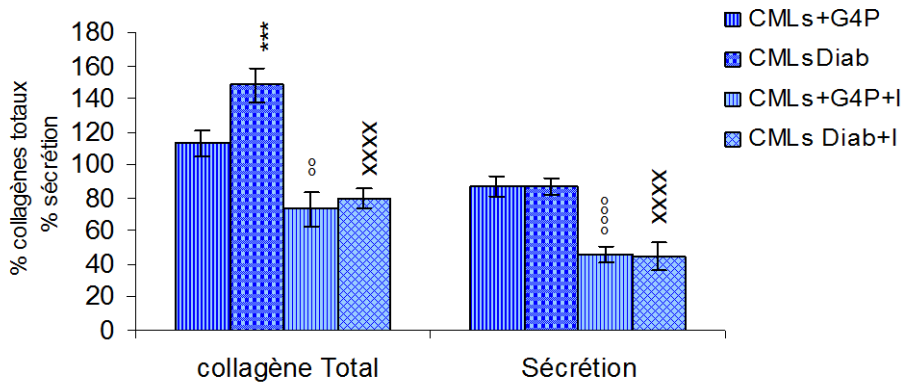


Figure 64 - Influence de l'insuline à 4 mU/ml pendant 48h sur les taux de collagènes et leur taux de sécrétion dans les CML de P.o en culture secondaire incubées durant 4P dans du glucose et celles provenant de P.o diabétique, au phénotype S.

Les valeurs sont les moyennes ± l'écart type de six déterminations
(*) Effets du glucose durant 4P vs état Diab
(°) Influence de l'insuline vs témoins correspondants
(x) Influence de l'insuline vs témoins normaux

E. SECRETION DES COLLAGENES (FIG. 65)

- Elle est estimée en pourcentage et déterminée pour chaque condition expérimentale.
- Elle est plus élevée à l'état synthétique qu'à l'état contractile.

- Elle augmente sensiblement sous l'effet de glucose pendant 48h notamment à l'état synthétique.
- La présence de glucose dans le milieu d'incubation pendant 4P et l'état de diabète provoquent une augmentation très significative de la sécrétion des collagènes totaux.
- L'influence de l'insuline pendant 48h induit une diminution très sensible du taux de cette sécrétion.
- Les rapports de diminution révèlent une plus grande sensibilité des CMLs de P.o. En effet, nous relevons respectivement pour les CMLs de R.n incubées et diabétiques un rapport égal à 1,5 et 1,6 alors que dans les CMLs de P.o, le rapport de diminution est environ égal à 1,9

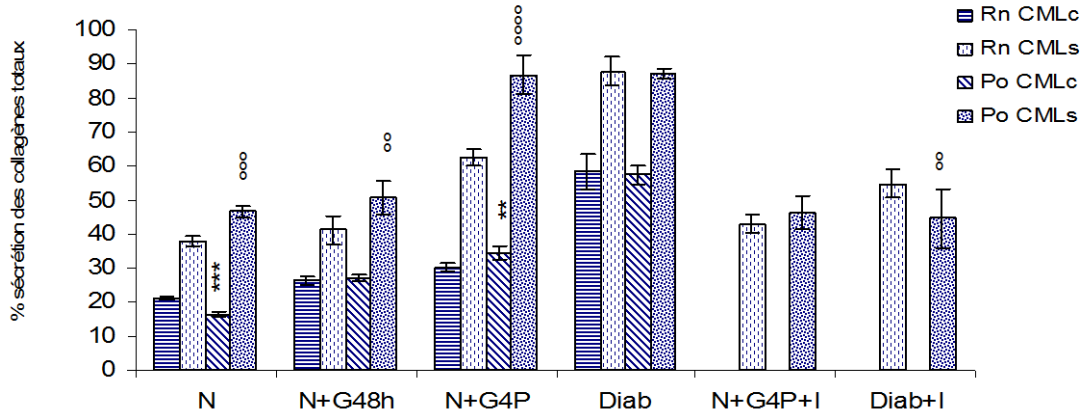


Figure 65 - Taux de sécrétion des collagènes par les CML aortiques de R.n et P.o en culture secondaire dans les différentes conditions expérimentales étudiées aux phénotypes C et S.

Les valeurs sont les moyennes de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Etat C des CML de P.o dans les différentes conditions expérimentales vs états C correspondants des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o dans les différentes conditions expérimentales vs états S correspondants des CML de R.n
L'analyse statistique entre état C et S a révélé des différences très significatives pour les deux espèces ($p < 0.0001$).

F. Conclusion (Fig. 66, 67, 67)

- **Les taux de synthèse des collagènes totaux sont comparables aux états contractiles des deux espèces.**
- **Quel que soit le phénotype cellulaire (C et S), le collagène est plus représenté dans le CEC que dans le CIC.**
- **En présence de glucose dans le milieu d'incubation, la synthèse des collagènes augmente significativement après 48h et très significativement après 4P**
- **Dans les CML de diabétiques, la synthèse des collagènes est exagérée notamment à l'état synthétique.**
- **La prédominance de collagène dans le CEC/CIC est significative dans les conditions expérimentales normales et pathologiques à l'exception de l'effet du glucose pendant 48h dans les CMLs de P.o.**
- **En présence d'insuline pendant 48h, la synthèse des collagènes diminue très sensible dans toutes les conditions expérimentales étudiées. Toutefois, comparativement au CEC, le CIC des CMLs incubées ne montre pas de diminution importante ; les résultats sont corrélés au taux de sécrétion fortement diminué.**
- **Sous l'effet de l'insuline :**
  - **les différences statistiques dans les mesures d'incorporation de proline tritiée entre CEC et CIC sont significatives en présence de**

glucose (p < 0,01) et non significatives à l'état diabétique, ce qui s'expliquerait par la diminution du taux de sécrétion.

*** Les rapports de diminution révèlent une plus grande sensibilité des CMLs de P.o qui marquent un rapport de 1,9 *vs* 1,5 à 1,6 pour les CMLs de R.n.**

*** Enfin, malgré leur importante diminution, les différents taux de synthèse des collagènes demeurent plus élevés que ceux de l'état basal.**

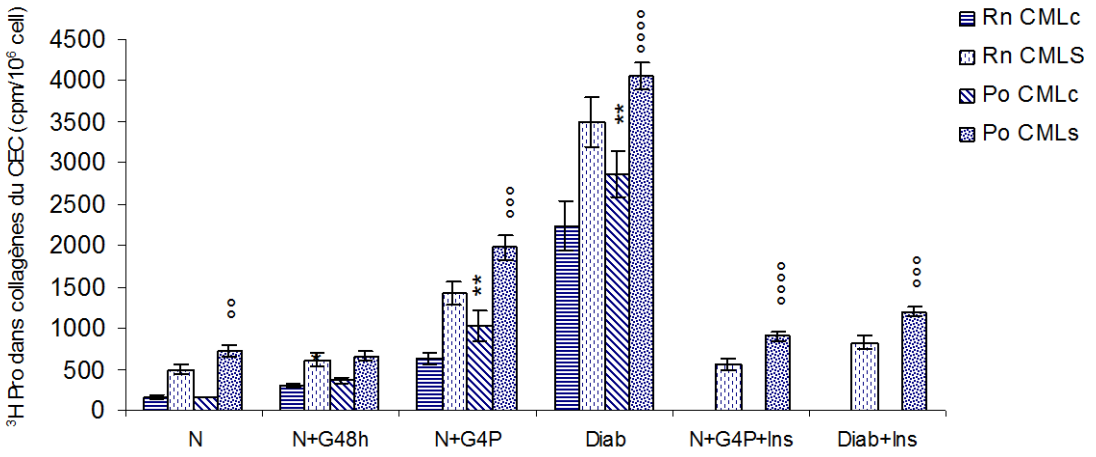


Figure 66 - Incorporation de ^{3}H Pro dans les collagènes du milieu (CEC) des CML de R.n et P.o en culture secondaire aux phénotypes C et S, dans les différentes conditions expérimentales étudiées.

Les valeurs sont les moyennes de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Etat C des CML de P.o dans les différentes conditions expérimentales vs états C correspondants des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o dans les différentes conditions expérimentales vs états S correspondants des CML de R.n
L'analyse statistique entre état C et S a révélé des différences très significatives pour les deux espèces ($p < 0.0001$).

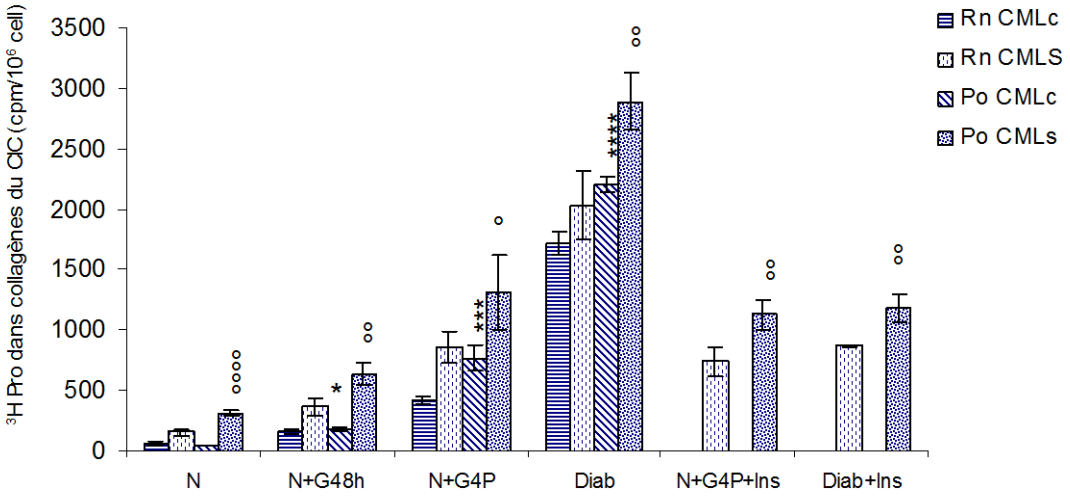


Figure 67 - Incorporation de ^{3}H Pro dans les CML (CIC) de R.n et P.o en culture secondaire aux phénotypes C et S, dans les différentes conditions expérimentales étudiées.

Les valeurs sont les moyennes de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Etat C des CML de P.o dans les différentes conditions expérimentales vs états C correspondants des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o dans les différentes conditions expérimentales vs états S correspondants des CML de R.n
L'analyse statistique entre état C et S a révélé des différences très significatives pour les deux espèces ($p < 0.001$) .

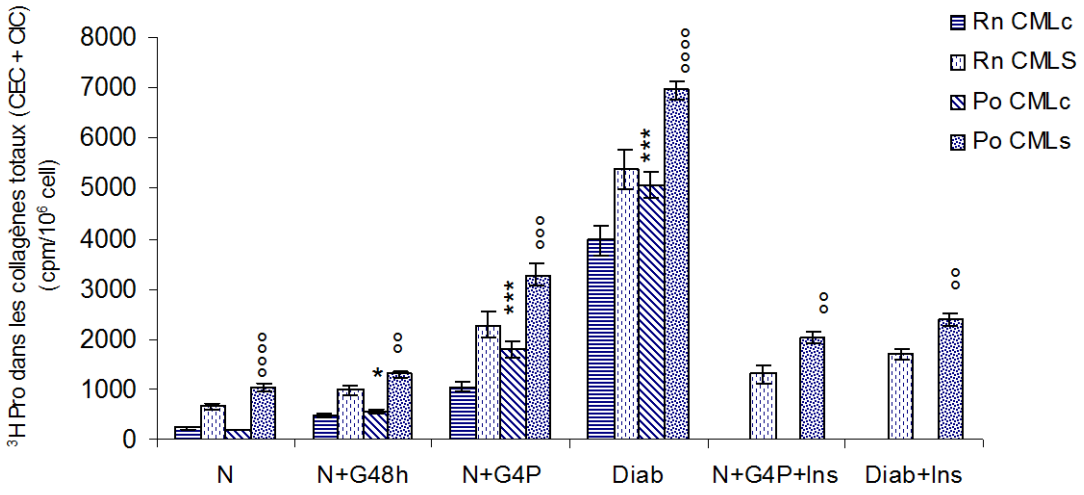


Figure 68 - Taux des collagènes totaux dans les deux compartiments extra- (CEC) et intracellulaires (CIC) des CML aortiques de R.n et P.o en culture secondaire dans les différentes conditions expérimentales étudiées aux phénotypes C et S.

Les valeurs sont les moyennes de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Etat C des CML de P.o dans les différentes conditions expérimentales vs états C correspondants des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o dans les différentes conditions expérimentales vs états S correspondants des CML de R.n
L'analyse statistique entre état C et S a révélé des différences très significatives pour les deux espèces ($p < 0.0001$).

CHAPITRE III :

QUELQUES ASPECTS IMMUNOLOGIQUES ET BIOSYNTHESE DES CHAINES α1 ET α2 DES COLLAGENES I ET III PAR LES CML AORTIQUES EN SUBCULTURE

TABLEAU XV

EVALUATION DES TAUX DES CHAINES α1 (I + III) ET α2 (I) DES COLLAGENES I et III CONTENUS DANS LES CEC ET CIC DES CML DE R.n ET DE P.o, DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES

CEC		CML de Rn		CML de Po	
	Etat	%α1	% α2	% α1	% α2
N	C	10,4 ± 1,3	4,5 ± 0,4 ***	12,2 ± 1,0	6,1 ± 1,5 ***
	S	30,1 ± 1,3	21,7 ± 3,4 ***	44,9 ± 3,0	18,1 ± 2,5 ****
N+G48h	C	38,6 ± 0,4	13,1 ± 0,9 ****	44,2 ± 0,6	18,1 ± 2,5 ****
	S	47,9 ± 3,7	10,9 ± 1,6 ****	58,3 ± 3,6	38,6 ± 4,6 ***
N+G4P	C	45,6 ± 1,4	20,2 ± 1,6 ****	75,1 ± 5,8	33,6 ± 1,3 ****
	S	73,8 ± 6,6	43,2 ± 5,2 ****	90,7 ± 8,2	57,9 ± 3,9 ***
Diab	C	59,6 ± 1,7	32,7 ± 5,8 ****	104,2 ± 7,2	48,1 ± 5,0 ***
	S	121,3 ± 6,6	67,9 ± 5,9 ****	140,0 ± 7,66	90,5 ± 5,4 ****
N+G4P+Ins	S	63,4 ± 2,5	22,0 ± 1,5 ****	71,8 ± 3,0	23,3 ± 3,1 ****
Diab+Ins	S	80,1 ± 4,9	23,1 ± 3,6 ****	102,0 ± 4,6	29,1 ± 2,5 ****

CIC	Etat	%α1	% α2	% α1	% α2
N	C	4,7 ± 0,4	3,0 ± 0,6 **	2,4 ± 0,2	1,8 ± 0,2 **
	S	13,3 ± 2,1	6,6 ± 1,1 ***	15,0 ± 1,5	7,3 ± 1,6 **
N+G48h	C	32,8 ± 2,1	14,4 ± 0,8 ****	47,8 ± 5,4	11,6 ± 1,7 ***
	S	63,2 ± 9,9	17,3 ± 6,7 **	70,4 ± 8,0	50,0 ± 8,1 *
N+G4P	C	48,6 ± 1,3	17,2 ± 1,3 ****	73,2 ± 9,5	33,5 ± 2,3 ***
	S	72,9 ± 8,0	29,2 ± 7,3 ***	101,1 ± 6,8	42,9 ± 8,4 ****
Diab	C	54,2 ± 6,0	29,4 ± 2,7 ***	107,0 ± 4,4	47,0 ± 3,0 ****
	S	104,0 ± 16,6	42,9 ± 5,2 ***	139,2 ± 4,5	94,8 ± 5,7 ****
N+G4P±Ins	S	74,4 ± 5,9	23,3 ± 5,0 ****	100,3 ± 5,6	34,0 ± 3,8 ****
Diab+Ins	S	70,0 ± 7,8	39,4 ± 3,2 **	82,2 ± 13,5	32,6 ± 10,5 ***

Le taux des chaînes a est déterminé par intégration numérique
Les valeurs sont les moyennes de six déterminations ± l'écart type
* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, ****, p < 0,0001 : α2 ***vs*** α1

I. QUANTIFICATION DES CHAINES α1 ET α2 DES COLLAGENES I ET III

Les chaînes α1 et α2 des collagènes I et III sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10% dans les conditions dénaturantes (Fig. 26).

Suite à la coloration du gel au bleu de Coomassie à 0,25% et sa décoloration dans l'acide acétique à 10%, les bandes correspondant aux chaînes α1 (I + III) et α2 (I) sont quantifiées par intégration densitométrique.

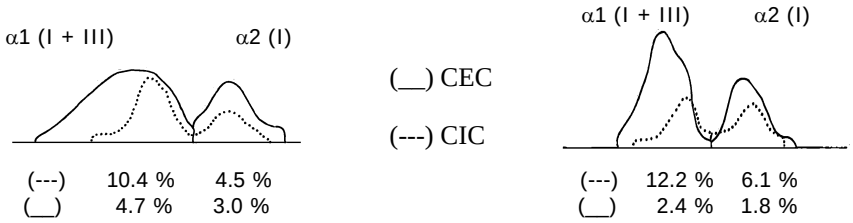
A. ETAT BASAL (TAB. XV, XVI)

L'évaluation des aires en % par intégration numérique, reportée sur le tableau XV indique que :

- l'état synthétique est caractérisé par un taux de chaînes α1 et α2 plus élevé que l'état contractile.
- aux deux états phénotypiques, le CEC est plus riche en chaînes α1 et α2 que le CIC
- les rapports α1/α2 estimés dans les CEC et CIC des CMLs, indiqués sur le tableau XVI sont en moyenne respectivement équivalents à 1,4 et 2,0 pour les CML de R.n ; 1,8 et 2,2 pour les CML de P.o.

D. 1. ETAT CONTRACTILE (Fig. 69)

CML de R.n **CML de P.o**

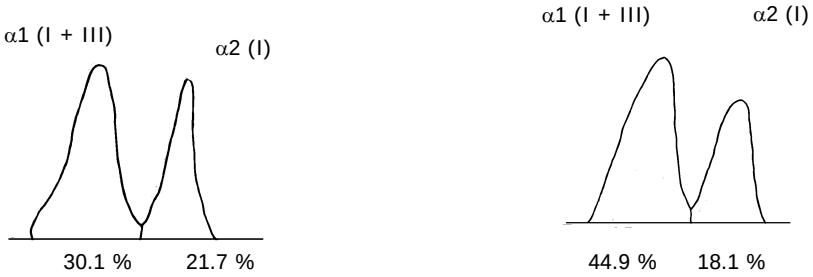


(---) 10.4 % 4.5 %
(__) 4.7 % 3.0 %

(---) 12.2 % 6.1 %
(__) 2.4 % 1.8 %

2. ETAT SYNTHETIQUE : (70 a, b)

2.1. Compartiment extracellulaire (Fig. 70 a)



30.1 % 21.7 %

44.9 % 18.1 %

2.2. Compartiment intracellulaire (Fig. 70 b)

13.3 % 6.6 %

15.0 % 7.3 %

TABLEAU XVI

ESTIMATION DU RAPPORT $\alpha 1/\alpha 2$ DANS LES COMPARTIMENTS EXTRA- ET INTRA-CELLULAIRES POUR LES CML DE R.n ET P.o DANS TOUTES LES CONDITIONS EXPERIMENTALES

		CEC		CIC	
	Etat	CML de R.n	CML de P.o	CML de R.n	CML de P.o
N	C	2,3 ± 0,3	2 ± 0,4	1,7 ± 0,5	1,4 ± 0,3
	S	1,4 ± 0,2	1,8 ± 0,1	2,0 ± 0,2	2,2 ± 1,0
N+G48h	C	3,0 ± 0,2 °°°	2,5 ± 0,3 °°	2,3 ± 0,3 °°	4,3 ± 1,3 °°°
	S	4,4 ± 0,3 ***	1,5 ± 0,2 **	4,5 ± 2,8 ***	1,5 ± 0,5 **
N+G4P	C	2,3 ± 0,2 °°	2,2 ± 0,1°°	2,0 ± 0,3 °°	2,2 ± 0,3 °°°
	S	1,7 ± 0,1****	1,6 ± 0,2 *	2,7 ± 0,7 **	2,4 ± 0,4 ***
Diab	C	1,9 ± 0,3 °°	2,2 ± 0,3	1,9 ± 0,3 °°	2,3 ± 0,2
	S	1,8 ± 0,1	1,5 ± 0,2 *	2,5 ± 0,6 *	1,5 ± 0,1 ***
N+G4P+Ins	S	2,9 ± 0,1¤¤¤¤	3,1 ± 0,4 ¤¤¤¤	3,3 ± 0,6 ¤¤¤	3,0 ± 0,2 ¤¤
Diab+Ins	S	3,9 ± 1,1 ¤¤¤¤	3,5 ± 0,6 ¤¤¤¤	2,5 ± 0,6	2,7 ± 0,4 ¤¤

Les valeurs sont les moyennes de six déterminations ± l'écart type

(°) Etat C de Diab ***vs*** état C + G 4P ***vs*** état C + G 48h ***vs*** état C basal

(*) Etat S de Diab ***vs*** état S + G 4P ***vs*** état S + G 48h ***vs*** état S basal

(¤) Influence de l'insuline ***vs*** témoins correspondants

B. EFFET DE GLUCOSE A COURT ET LONG TERME

1. EFFET DU GLUCOSE PENDANT 48 H (TAB XV, FIG. 71a, b)

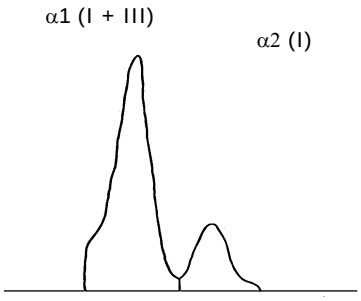
Après une incubation de 48h dans un milieu enrichi en glucose (15mM), nous relevons dans les CEC et CIC des CML contractiles et synthétiques de R.n ainsi que des CML contractiles de P.o une augmentation du taux global des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ en faveur des chaînes $\alpha 1$. Ce qui induit une augmentation des rapports $\alpha 1/\ \alpha 2$ (3,0 et 2,5 pour les CEC respectifs des CMLc de R.n et P.o ; 2,3 et 4,3 pour les CIC respectifs des CMLc de R.n et P.o).

Les CEC et CIC des CML synthétiques de P.o présentent quant à elles une diminution des rapports $\alpha 1/\alpha 2$ (1,5) expliquée par une élévation des chaînes $\alpha 2$ par rapport aux chaînes $\alpha 1$.

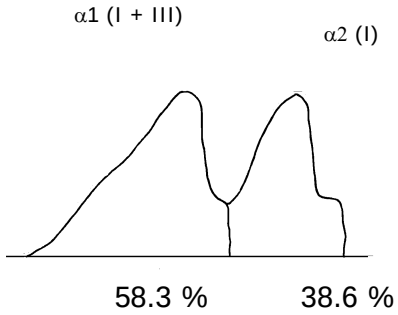
Pour l'aperçu des profils des chaînes a, nous nous sommes limités à ceux relevés au phénotype synthétique.

1.1. Compartiment extracellulaire (Fig. 71a)

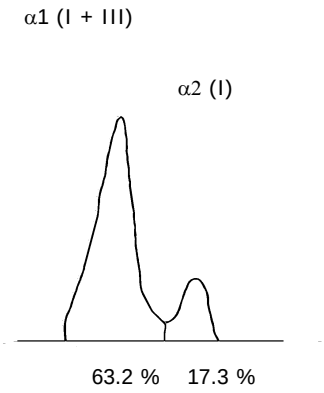
CMLs de R.n

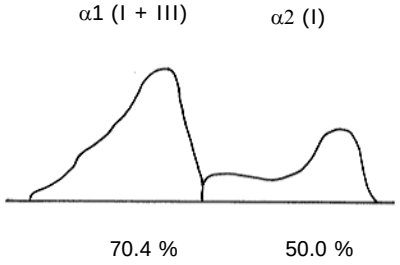


CMLs de P.o



1.2. Compartiment intracellulaire (Fig. 71b)





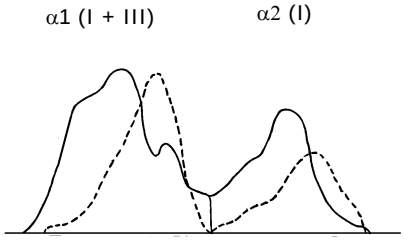
2. EFFET DU GLUCOSE DURANT 4 PASSAGES ET INFLUENCE DE L'INSULINE (FIG. 72a, b)

Par rapport à l'incubation de 48h, les CML, notamment à l'état synthétique, se caractérisent par une élévation des taux des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ dans les 2 compartiments.

Nous observons par ailleurs une diminution du rapport $\alpha 1/\alpha 2$ dans le CEC le CIC des CMLs de R.n indiquant une augmentation des chaînes $\alpha 2$ par rapport aux chaînes $\alpha 1$. Dans le CEC de P.o, $\alpha 1/\alpha 2$ est peu modifié alors qu'il s'élève dans le CIC indiquant une diminution des chaînes $\alpha 1/\alpha 2$.

2.1.Compartiment extracellulaire (Fig.72a)

CMLs de Rn

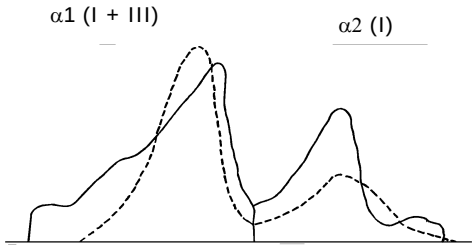


(__) + G 4P

(---) + G 4P +Ins

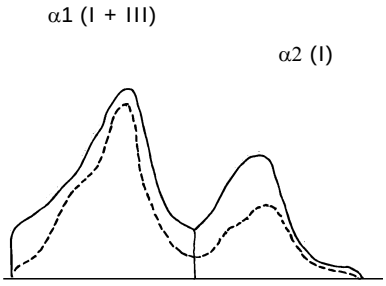
(__)	73.8 %	43.2 %
(---)	63.4 %	22.0 %

CMLs de P.o



(__)	90.7 %	47.9 %
(---)	71.8 %	23.3 %

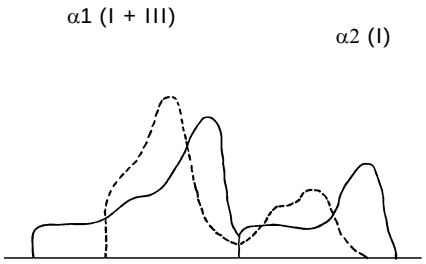
2.2. Compartiment intracellulaire (Fig. 72b)



(__) + G 4P

(---) + G 4P + Ins

(__)	72.9 %	29.2 %
(---)	74.4 %	23.3 %



(__)	101.1 %	42.9 %
(---)	100.3 %	34.0 %

C. ETATS DIABETIQUES ET INFLUENCE DE L'INSULINE (TAB XV, FIG. 73a, b)

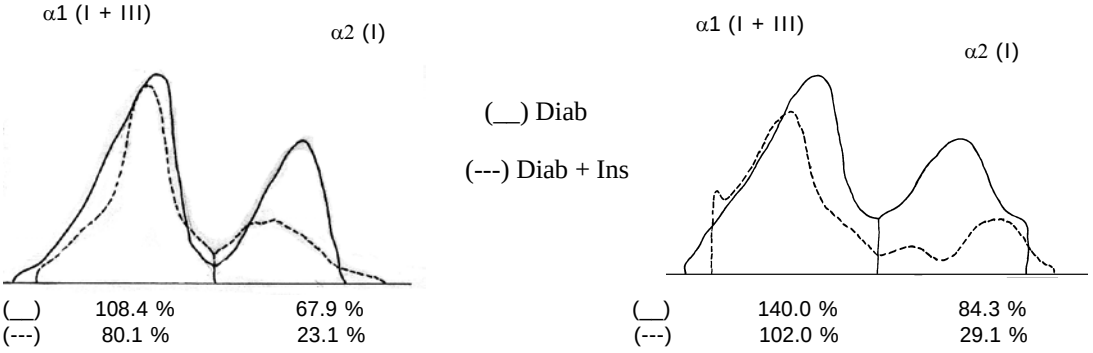
L'intégration des chaînes α indique une élévation de leurs taux dans les deux compartiments. L'étude statistique révèle des différences significatives par rapport à l'état basal et aux incubations à court terme.

Dans certains compartiments (CEC des CMLs de R.n, CEC des CMLc de P.o, CIC des CMLc de P.o), l'évolution du rapport $\alpha1/\alpha2$ est comparable à celle observée au cours de l'incubation à long terme. Dans les autres compartiments, nous notons une diminution du rapport $\alpha1/\alpha2$ dont la plus sensible apparaît dans le CIC des CMLs de P.o.

En définitive, outre l'élévation très sensible des taux des chaînes $\alpha1$ et $\alpha2$, les chaînes $\alpha2$ sont augmentées par rapport aux chaînes $\alpha1$ dans la plupart des compartiments, ce qui diminue le rapport $\alpha1/\alpha2$.

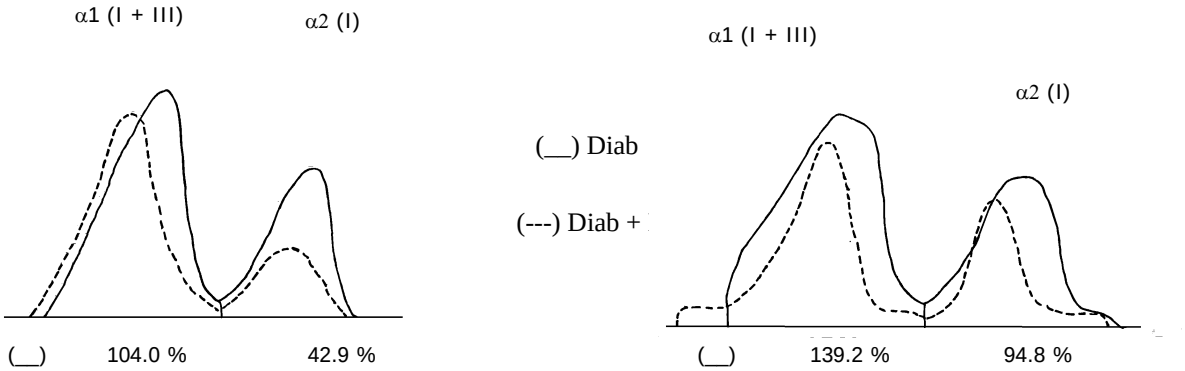
1. COMPARTIMENT EXTRACELLULAIRE (FIG. 73a)

CMLs de Rn **CMLs de P.o**



(__)	108.4 %	67.9 %	(__)	140.0 %	84.3 %
(---)	80.1 %	23.1 %	(---)	102.0 %	29.1 %

2. COMPARTIMENT INTRACELLULAIRE (FIG. 73b)



(__)	104.0 %	42.9 %	(__)	139.2 %	94.8 %
(---)	70.0 %	39.4 %	(---)	82.2 %	32.6 %

L'influence de l'insuline sur les CMLs incubées à long terme dans un milieu enrichi en glucose et sur les CMLs de diabétiques révèle :

- une diminution des proportions des chaînes $\alpha1$ et $\alpha2$
- une augmentation statistiquement très significative des rapports $\alpha1/\alpha2$ comparativement aux témoins correspondants, indiquant une diminution des chaînes $\alpha2$ par rapport aux chaînes $\alpha1$.

D. Conclusion

L'évolution du rapport $\alpha 1/\alpha 2$ dans les différentes conditions expérimentales indique que :

- **A l'état basal le rapport $\alpha 1/\alpha 2$ traduit un taux de chaînes $\alpha 1$ supérieur à celui de $\alpha 2$,**
- **Après une incubation de 48h, il augmente montrant que les chaînes $\alpha 1$ augmentent par rapport aux chaînes $\alpha 2$ dans les CEC et CIC des CMLc et CMLs de Rn ainsi que des CMLc de Po ; il diminue dans les CEC et CIC des CMLs de P.o,**
- **Après une incubation de 4P, le rapport $\alpha 1/\alpha 2$ diminue traduisant une augmentation des chaînes $\alpha 2$ par rapport aux chaînes $\alpha 1$**
- **A l'état diabétique, l'évolution du rapport est comparable à celle de l'incubation à long terme mais plus marquée notamment dans le CIC des CMLs de Po**
- **Après action de l'insuline pendant 48h, les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ diminuent avec une augmentation du rapport traduisant une diminution des chaînes $\alpha 2$ par rapport aux chaînes $\alpha 1$**

II. PROCEDE IMMUNOLOGIQUE

Dans cette étude, nous avons tenté de rechercher un impact des effets du glucose à long terme et du diabète sur la reconnaissance des sites antigéniques des chaînes α par les anticorps correspondants sachant qu'au cours d'états pathologiques comme le diabète et l'athérosclérose, la molécule de collagène subit des modifications importantes comme la glycation.

A. ANTICORPS ANTICOLLAGENE I et III

Dans un premier temps, nous avons, par immunisation, induit la production d'anticorps anti collagène I chez le lapin et d'anticorps anti collagène III chez le bouc par injection respective de solutions de collagène I et III (Sigma) correspondants aux antigènes.

Dans une 2ème partie, nous avons visualisé les arcs de précipitation correspondants aux anticorps anti collagène I et III par électrosynérèse. Cette dernière a révélé l'anticorps anti α1 spécifique au collagène III (Fig. 74) et les anticorps anti α1 et anti α2 spécifiques au collagène I (Fig. 75).

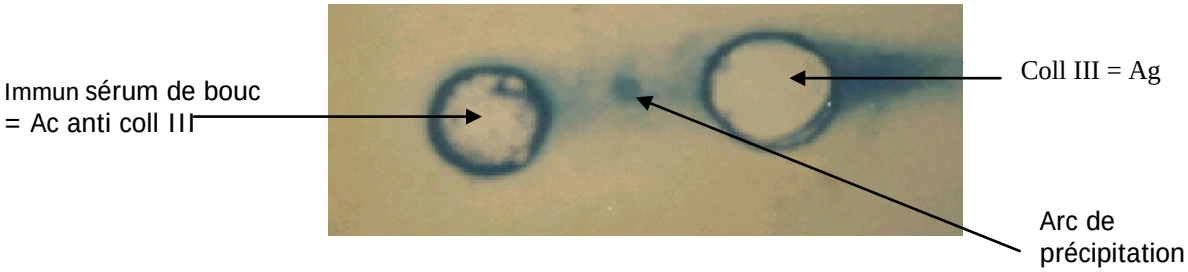


Figure 74 - Mise en évidence, par électrosynérèse, de l'arc de précipitation correspondant à l'anticorps anti α1 spécifique aux chaînes α1 du collagène III, contenu dans l'immunsérum de bouc.

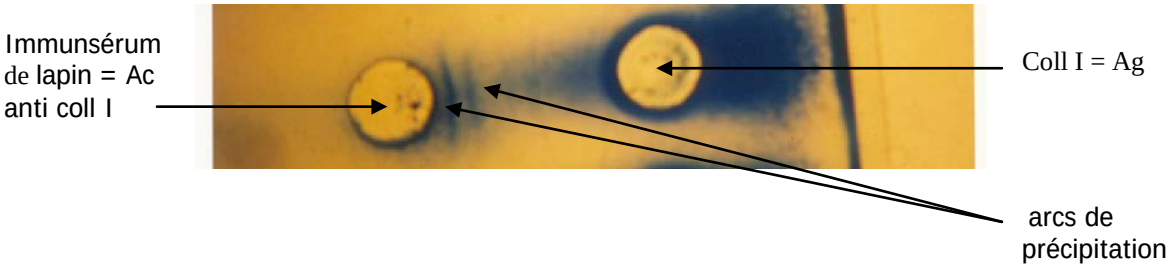


Figure 75 - Mise en évidence, par électrosynérèse, des deux arcs de précipitation correspondant aux anticorps anti α1 et anti α2 spécifiques aux chaînes α1 et α2 du collagène I contenus dans l'immunsérum de lapin.

B. IMMUNOBLOTTING (FIG. 76, 77)

Dans cette partie des résultats, nous avons procédé à la reconnaissance des sites antigéniques des chaînes α des collagènes I et III dans les CEC et CIC des CMLs de R.n et P.o en culture secondaire, dans les différentes conditions expérimentales étudiées au phénotype synthétique. Seuls les résultats concernant les CML de P.o ont été reportés, ceux de R.n étant analogues.

1. CHAINES α1 ET α2 DU COLLAGENE I

La mise en évidence des déterminants antigéniques du collagène I dans le CEC et le CIC par immunoblotting a montré que la reconnaissance des chaînes α1 et α2 des CMLs de R.n et de P.o diabétiques, des CMLs incubées à long terme dans un milieu enrichi en glucose 15 mM et des CMLs sous influence insulinique par les anticorps correspondants est tout à fait comparable à celle des chaînes α des témoins normaux . En effet, les modifications que peuvent subir les molécules dans un état pathologique, comme la glycation dans le cas de complications diabétiques, ne semblent pas altérer les sites antigéniques des chaînes α1 et α2 des collagènes I (Fig. 76, 77). C'est ainsi que les 2 bandes spécifiques aux chaînes α1 et α2 se caractérisent par une épaisseur et une intensité proportionnelles aux taux de collagène I estimé et correspondant à la condition expérimentale étudiée.

1.1. Compartiment extracellulaire des CMLs de P.o (76)

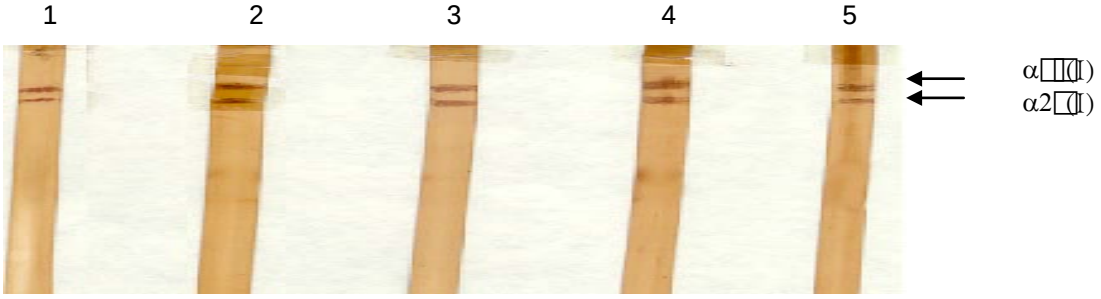


Figure 76 - Immunoblotting des chaînes α1 (I) et α2 (I) du collagène I contenues dans le CEC de CML au phénotype synthétique, dans les différentes conditions expérimentales étudiées.

Après électrophorèse SDS PAGE, transfert et immunorévélation, les sites antigéniques des chaînes α1 et α2 sont reconnus aussi bien dans les conditions pathologiques que dans les conditions normales.

1 : normal ; 2 : + G 48h ; 3 : + G 4P ; 4 : Diab ; 5 : Diab + Ins

1.2. Compartiment intracellulaire des CMLs de P.o (77)

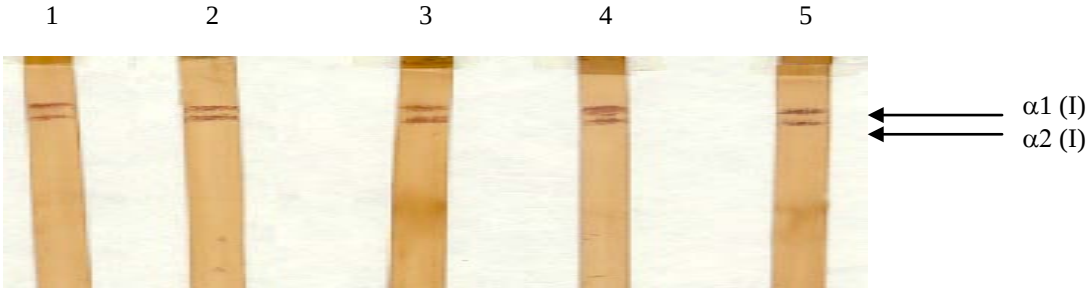


Figure 77 - Immunoblotting des chaînes α1 (I) et α2 (I) du collagène I contenues dans le CIC des CML de P.o au phénotype synthétique, dans les différentes conditions expérimentales étudiées.

Les mêmes observations sont relevées dans le CIC ; les chaînes α1 et α2 sont reconnues quelque soit la condition expérimentale. 1 : normal ; 2 : + G 48h ; 3 : + G 4P ; 4 : Diab ; 5 : Diab + Ins

2. CHAINES α2 DU COLLAGENE I

Afin de mieux apprécier ces résultats, nous avons procédé, par absorbance, à une purification et un isolement de l'anticorps anti α2 (Fig. 78). Le transfert, réalisé en présence de cet anticorps a permis de confirmer le résultat observé sur la figure 76 qui a indiqué :
- une bonne reconnaissance des sites antigénigues des chaînes α2 des collagènes I
- une biosynthèse exagérée de ce type de collagènes dans les CML de R.n et de P.o diabétiques et celles incubées à long terme dans le glucose
- L'effet favorable de l'insuline sur la diminution de la biosynthèse des collagènes.

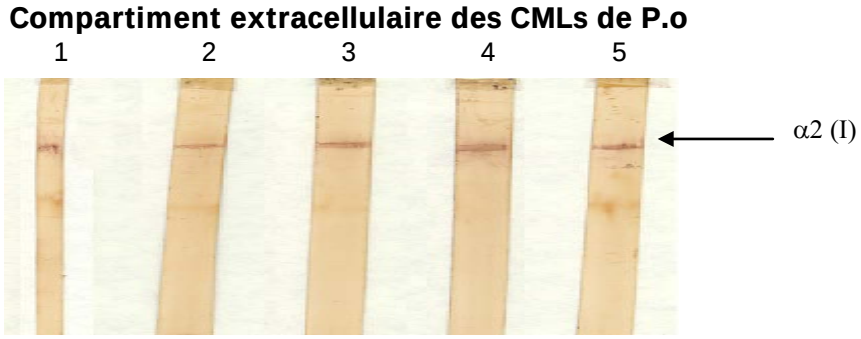


Figure 78 - Immunoblotting des chaînes α2 (I) des CEC des CML de P.o, après absorbance, dans les différentes conditions expérimentales étudiées au phénotype S.
Après absorbance (reconnaissance des chaînes α1 du collagène III par les anticorps anti anti α1 du collagène I), le blott révèle uniquement les chaînes α2 reconnues par l'anticorps anti α2.
1 : normal ; 2 : + G 48h ; 3 : + G 4P ; 4 : Diab ; 5 : Diab + Ins

3. CHAINES α1 DU COLLAGENE III

Pour ce qui est du collagène III, les résultats de l'électrotransfert ont révélé des réactions croisées indiquant l'absence de spécificité de l'Ac vis à vis des sites antigéniques correspondants. En effet, les anticorps anti α1 correspondant aux anticorps anti collagène III (Fig. 79) ont également reconnu les chaînes α2 du collagène I. C'est ainsi qu'après transfert, incubation en présence de l'anticorps anti α1 et immunorévélation, nous avons observé, non pas une bande (spécifique au collagène III) mais deux bandes indiquant la reconnaissance des chaînes α1 et α2

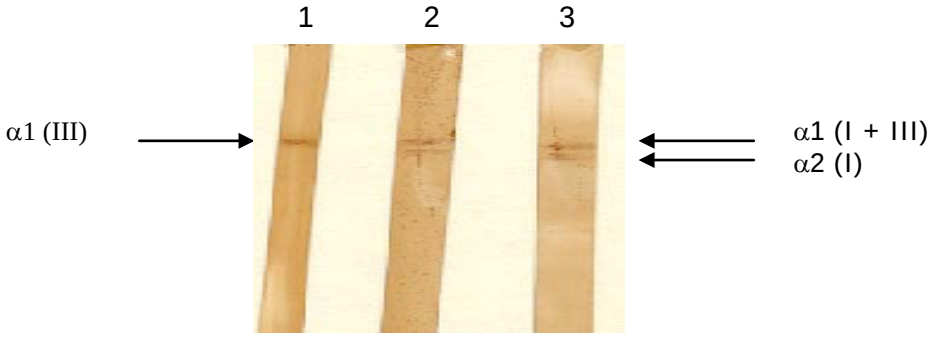


Figure 79 - Immunoblotting des chaînes α1 des collagènes III dans certaines conditions expérimentales.
L'anticorps anti α1 correspondant à l'anticorps anti collagène III, spécifique des chaînes α1, reconnaît également les chaînes α2 du collagène I en 2, 3,. La bande 1 témoin (collagène III dilué au 1/3 dans la collagénase en présence de l'immunsérum de bouc contenant l'anticorps anti α1) révèle une seule bande correspondant à la chaîne α1 du collagène III.
2 : CMLs de R.n normal ; 3 : CMLs de P.o normal. Les autres conditions expérimentales (+G 48h, 4P et état de diabète) ont montré les mêmes résultats.

C. CONCLUSION

Le transfert des chaînes α1 et α2 des collagènes I et III réalisés dans les deux compartiments des CML synthétiques de R.n et P.o ayant révélé des résultats analogues seuls ceux de P.o ont été mis en exergue. Ils ont montré que :

- les sites antigéniques des chaînes α1 et α2 du collagène I sont reconnus par les anticorps correspondants (anticorps anti α1 et anti α2 contenus dans l'immunsérum de lapin) quel que soit la condition expérimentale

- Après absorbance de l'anticorps anti collagène I, l'anticorps anti α2 reconnaît spécifiquement les chaînes α2 du collagène I

- L'anticorps anti α1 (contenu dans l'immunsérum de bouc spécifique du collagène III) reconnaissant les deux types de chaînes induit une réaction croisée.

III. BIOSYNTHESE DES COLLAGENES I ET III (Tab. XVII, XVIII, XIX, XX, XXI, XXII)

Le collagène pepsino-résistant contenu dans les compartiments extra- et intracellulaires, est marqué à la proline tritiée (^{3}H Pro). Il est séparé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10% de SDS en ses chaînes α1 (I + III) et α2 (I).

L'incorporation de la radioactivité dans chaque type de collagène exprimée en cpm/10^6 cellules est déterminée par rapport au collagène total marqué.

Les taux des collagènes I et III des CEC et CIC sont déterminés par intégration numérique.

Les taux des collagènes I et III totaux sont évalués à partir des collagènes I et III contenus dans les deux compartiments (CEC + CIC).

La proportion du collagène synthétisé (I ou III) correspond au rapport de la radioactivité contenue dans le CEC sur la radioactivité totale contenue dans les deux compartiments (CEC + CIC) ; la valeur obtenue est rapportée à la proportion de chaque type de collagène.

Les résultats rapportant les taux de collagène I et III contenus dans les CEC et CIC de toutes les conditions expérimentales sont indiqués en annexe (Tab. XXI, XXII).

A. ETAT BASAL (FIG. 80, 81)

١. *ETAT CONTRACTILE*

L'incorporation de ^{3}H-Pro dans les deux compartiments indique que le taux de collagène I total est plus représenté que celui du collagène III : (13,6 ± 1,0 % vs 9,1 ± 0,6 % dans les CMLc de R.n et 13,7 ± 0,9 % vs 8,7 ± 0,7 % dans les CMLc de P.o) (Tab. XIX).

La différence statistique entre les moyennes obtenues chez les deux espèces est non significative pour le collagène I et peu significative ($p < 0,05$) pour le collagène III.

Chez les deux espèces, l'incorporation de la proline tritiée contenue dans les deux types de collagène est équivalente dans les compartiments respectifs (p : NS). En effet, dans le CEC des CMLc de R.n et de P.o, nous enregistrons respectivement 81 ± 17 et 84 ± 5 cpm/10^6 cellules pour le collagène I ; 47 ± 9 et 44 ± 3 cpm/10^6 cellules pour le collagène III.

Dans le CIC, nous relevons 24 ± 3 et 28 ± 8 cpm/10^6 cellules pour le collagène I ; 17 ± 1 et 19 ± 5 cpm/10^6 cellules pour le collagène III.

Les différences des moyennes obtenues entre les deux compartiments sont très significatives ($P < 0,0001$) pour les deux espèces (Tab. XVII, XVIII).

Le taux de sécrétion des deux collagènes est faiblement représenté, toutefois il demeure plus élevé pour le collagène I ($p < 0,001$, $p < 0,01$ respectivement dans les CML de R.n et de P.o) (Tab. XX).

٢. *ETAT SYNTHETIQUE*

Comparativement à l'état contractile, les taux moyens des collagènes I totaux sont également plus élevés que ceux des collagènes III : 45,5 ± 4,1 % vs 26,2± 1,4 % dans les CMLs de R.n ($p < 0,001$) et 56,4 ± 3,2 % vs 35,6 ± 2,5% pour les CMLs de P.o ($P< 0,001$). En outre, ces résultats indiquent que les taux de synthèse des collagènes I et III

TABLEAU XVII

INCORPORATION DE ^{3}H PRO (cpm/10^{6} cellules) DANS LES COLLAGENES I ET III CONTENUS DANS LES CEC DES CML DE R.n ET P.o EN CULTURE DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES

CEC		CML de Rn				CML de Po			
	Etat	Collagène I		Collagène III		Collagène I		Collagène III	
N	C	81 ± 17		47 ± 9		84 ± 5		44 ± 3	
	S	236 ± 27		160 ± 25		254 ± 24		175 ± 34	
N+G48h	C	143 ± 18	°°°	102 ± 12	°°°	152 ± 17	°°°	142 ± 16	°°°°
	S	261 ± 50		230 ± 35	**	342 ± 31	**	186 ± 30	
N+G4P	C	321 ± 41	°°°	229 ± 32	°°	447 ± 95	°°	375 ± 80	°°°
	S	705 ± 79	***	430 ± 46	***	1231 ± 133	****	793 ± 67	****
Diab	C	849 ± 146	°°°	547 ± 126	°°	1409 ± 67	°°°°	981 ± 59	°°°°
	S	1610 ± 227	***	1005 ± 115	***	2351 ± 116	****	1410 ± 83	***
N+G4P+Ins	S	246 ± 30	¤¤¤	198 ± 25	¤¤¤ x	454 ± 44	¤¤¤ xxx	377 ± 47	¤¤¤ xxx
Diab+Ins	S	455 ± 60	¤¤¤¤ xx	396 ± 37	¤¤¤¤ xxx	510 ± 25	¤¤¤¤ xxxx	447 ± 31	¤¤¤¤ xxx

TABLEAU XVIII

BIOSYNTHESE DES COLLAGENES I ET III (cpm/10^{6} cellules) PAR LES CML DE R.n ET P.o EN CULTURE DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES

CIC		CML de R.n				CML de P.o			
	Etat	Collagène I		Collagène III		Collagène I		Collagène III	
N	C	24 ± 3		17 ± 1		28 ± 8		19 ± 5	
	S	80 ± 14		58 ± 18		115 ± 10		72 ± 7	
N+G48h	C	69 ± 9	°°°	56 ± 8	°°°	80 ± 8	°°°	60 ± 5	°°°
	S	151 ± 33	**	144 ± 29	**	327 ± 50	***	184 ± 23	***
N+G4P	C	238 ± 24	°°°	189 ± 16	°°°°	362 ± 63	°°°	250 ± 33	°°°°
	S	388 ± 59	***	296 ± 64	**	545 ± 67	**	399 ± 46	***
Diab	C	594 ± 37	°°°°	378 ± 41	°°°	1026 ± 30	°°°	734 ± 33	°°°
	S	982 ± 176	**	714 ± 89	**	1503 ± 143	***	834 ± 67	**
N+G4P+Ins	S	322 ± 62	xxx	270 ± 37	xxxx	501 ± 59	xxxx	407 ± 43	xxxx
Diab+Ins	S	434 ± 70	¤¤¤ xxx	266 ± 21	¤¤¤ xxxx	541 ± 46	¤¤¤¤ xxx	415 ± 64	¤¤¤¤ xxxx

Les CML sont marquées avec ^{3}H Pro et le collagène pepsino-résistant des compartiments extra et intracellulaire marqué est séparé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10 % de SDS.

L'incorporation de la radioactivité dans chaque type de collagène exprimée en cpm/10^{6} cellules est déterminée par rapport au collagène total marqué à la proline tritiée.

Les valeurs sont les moyennes de six déterminations ± l'écart type.

(°) Etat C de Diab ***vs*** état C + G 4P ***vs*** état C + G 48h ***vs*** état basal C ; (*) Etat S de Diab ***vs*** état S + G 4P ***vs*** état S + G 48h ***vs*** état basal S ; (¤) influence de l'insuline ***vs*** témoins correspondants ; (x) influence de l'insuline ***vs*** état synthétique basal

TABLEAU XIX

TAUX DE SYNTHESE DES COLLAGENES I ET III TOTAUX (%) PAR LES CML DE R.n ET P.o DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES

		CML de R.n				CML de P.o			
	Etat	Collagène I		Collagène III		Collagène I		Collagène III	
N	C	13,6 ± 1,0		9,1 ± 0,6	++	13,7 ± 0,9		8,7 ± 0,7	++
	S	45,5 ± 4,1		26,11 ± 1,4	+++	56,4 ± 3,2		35,6 ± 2,5	+++
N+G48h	C	56,0 ± 1,11	°°°°	42,8 ± 1,4	°°°° ++	66,4 ± 2,5	°°°°	55,2 ± 3,4	°°°° ++
	S	72,7 ± 6,1	***	66,7 ± 6,9	****	140,1 ± 9,8	****	77,2 ± 3,9	**** +++
N+G4P	C	75,1 ± 1,0	°°°°	56,5 ± 1,11	°°°° ++	116,4 ± 4,3	°°°°	89,0 ± 5,2	°°°° +++
	S	131,1 ± 10,3	****	88,1 ± 4,1	**** +++	167,5 ± 12,6	**	115,1 ± 7,9	*** +++
Diab	C	107,6 ± 8,6	°°°	68,2 ± 3,9	°°° +++	179,6 ± 7,2	°°°	126,7 ± 6,5	°°° +++
	S	200,9 ± 14,9	***	135,2 ± 10,6	**** +++	290,8 ± 12,7	****	167,6 ± 6,5	** ++++
N+G4P+Ins	S	100,4 ± 8,2	¤¤ xxx	82,7 ± 4,7	¤ xxxx ++	126,0 ± 6,4	¤¤¤ xxxx	103,3 ± 5,2	¤ xxxx ++
Diab+Ins	S	122,5 ± 4,7	¤¤¤ xxxx	90,1 ± 7,4	¤¤¤xxxx+++	135,3 ± 14,2	¤¤¤¤ xxx	110,5 ± 6,6	¤¤¤xxxx++

Les taux de collagène I et III totaux déterminés par intégration numériquesont évalués à partir des collagènes I et III contenus dans le milieu et dans les cellules. Les valeurs sont les moyennes de six déterminations affectées de l'écart type
(°) Etat C de Diab ***vs*** état C + G 4P ***vs*** état C + G 48h ***vs*** état basal C ; (*) Etat S de Diab ***vs*** état S + G 4P ***vs*** état S + G 48h ***vs*** état basal S
(¤) influence de l'insuline ***vs*** témoins correspondants ; (x) influence de l'insuline ***vs*** état synthétique basal ; (+) Coll III ***vs*** Coll I

TABLEAU XX

TAUX DE SECRETION DES COLLAGENES I ET III TOTAUX (%) PAR LES CML DE R.n ET P.o EN CULTURE DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES

		CML de R.n				CML de P.o			
	Etat	Collagène I		Collagène III		Collagène I		Collagène III	
N	C	2,9 ± 0,2		2,1 ± 0,3		1,4 ± 0,2		2,3 ± 0,1	
	S	17,4 ± 0,9		9,9 ± 0,9		26,7 ± 1,7		16,17 ± 1,3	
N+G48h	C	14,7 ± 1,0	°°°°	11,3 ± 0,6	°°°°	18,0 ± 1,1	°°°°	15,0 ± 1,1	°°°°
	S	30,3 ± 4,1	****	27,5 ± 0,8	****	71,0 ± 5,9	***	39,4 ± 6,2	***
N+G4P	C	22,5 ± 1,1	°°°	16,9 ± 0,9	°°°	39,9 ± 3,6	°°°°	30,5 ± 3,0	°°°°
	S	81,9 ± 7,6	****	55,1 ± 4,3	****	145,0 ± 9,6	***	99,7 ± 5,7	****
Diab	C	60,4 ± 3,6	°°°°	38,4 ± 3,5	°°°°	103,4 ± 6,5	°	73,0 ± 4,2	°°°°
	S	175,6 ± 12,0	****	118,3 ± 10,9	****	241,2 ± 18,5	***	138,5 ± 11,1	**
N+G4P+Ins	S	43,3 ± 5,5	¤¤¤¤ xxxx	35,7 ± 4,2	¤¤¤ xxxx	58,4 ± 9,6	¤¤¤ xxxx	47,7 ± 7,0	¤¤¤¤ xxx
Diab+Ins	S	67,4 ± 8,7	¤¤¤¤ xxxx	49,7 ± 8,4	¤¤¤¤ xxxx	60,9 ± 18,7	¤¤¤¤ xxx	49,2 ± 12,1	¤¤¤¤ xxxx

Le taux de sécrétion est déterminé selon le rapport : (radioactivité du milieu / radioactivité totale) x taux de chaque type de collagène
Les valeurs sont les moyennes de six déterminations ± l'écart type.
(°) Etat C de Diab ***vs*** état C + G 4P ***vs*** état C + G 48h ***vs*** état basal C ; (*) Etat S de Diab ***vs*** état S + G 4P ***vs*** état S + G 48h ***vs*** état basal S ; (¤) influence de l'insuline ***vs*** témoins correspondants ;
(x) influence de l'insuline vs état synthétique basal

sont plus importants dans les CMLs de P.o que dans les CMLs de R.n (P < 0,01 pour les deux types de collagènes).

La proline tritiée incorporée dans les collagènes I et III et estimée dans les deux compartiments est statistiquement plus élevée dans le CEC que dans le CIC pour les CMLs des deux espèces étudiées. Dans les CMLs de R.n, nous relevons respectivement dans les compartiments extra et intracellulaires 236 ± 27 et 80 ± 14 cpm/10^6 cellules pour le collagène I (p < 0,0001) ; 160 ± 25 et 58 + 18 cpm/10^6 cellules pour le collagène III (p < 0,01). Dans les CMLs de P.o, nos résultats indiquent respectivement dans le milieu et dans les cellules : 254 ± 24 et 115 ± 10 cpm/10^6 cellules pour le collagène I (P< 0,0001) ; 175 ± 34 et 72 ± 7 cpm/10^6 cellules pour le collagène III (P<0,01).

Le taux de sécrétion du collagène I est statistiquement plus élevé que celui du collagène III (p < 0,0001). En outre, comparativement à l'état contractile, la sécrétion des collagènes I et III est plus importante à l'état synthétique. Ainsi les taux de sécrétion des collagènes I et III enregistrés sont de 17,4 ± 0,9 et 9,9 ± 0,9 % dans les CMLs de R.n ; 26,7 ± 1,7 et 16,, ± 1.3 % dans les CMLs de P.o (p < 0,0001).

En définitive l'analyse des résultats fait apparaître que :

- A l'état contractile, les taux des collagènes I et III totaux sont comparables entre les deux espèces.

- La synthèse des deux types de collagène est plus importante à l'état synthétique qu'à l'état contractile.

- Les collagènes I et III sont plus représentés dans le compartiment extracellulaire que dans le compartiment intracellulaire. Ils sont également plus importants dans les CMLs de P.o. (Tab. en annexe)

- Enfin, le collagène I est plus élevé que le collagène III aux deux états phénotypiques pour les deux espèces étudiées.

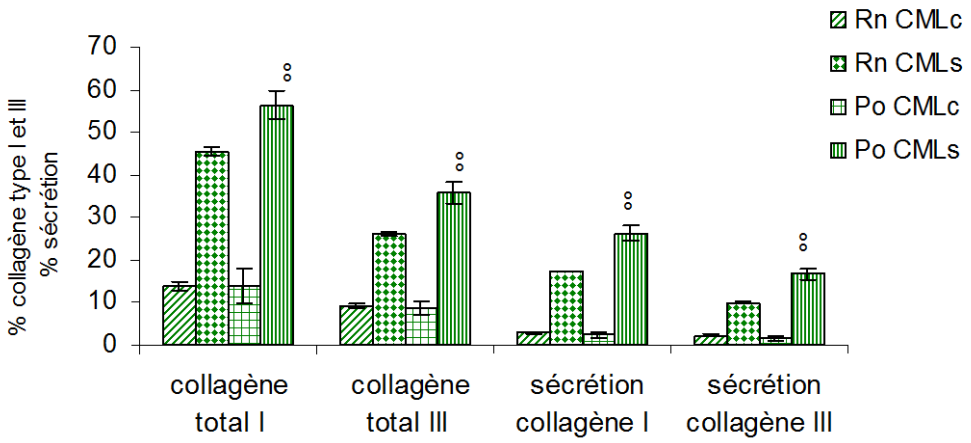


Figure 80 - Taux totaux des collagènes I et III, contenus dans le milieu et les cellules et taux de leur sécrétion par les CML de R.n et P.o en culture secondaire aux phénotypes C et S de l'état basal.

Les taux de collagène totaux sont évalués à partir des collagènes I et III contenus dans les deux compartiments (milieu + cellules).

Le taux de sécrétion du collagène I ou III est évalué par le produit : radiactivité du CEC / radioactivité totale (CEC + CIC) x taux de collagène I ou III

Les valeurs correspondent à la moyenne de six déterminations affectées de l'écart type.

(*) Etat C des CML de P.o vs état C des CML de R.n

(°) Etat S des CML de P.o vs état S des CML de R.n

L'analyse statistique entre état C et S a révélé des différences très significatives pour les deux types de collagène et pour les deux espèces (p < 0.0001).

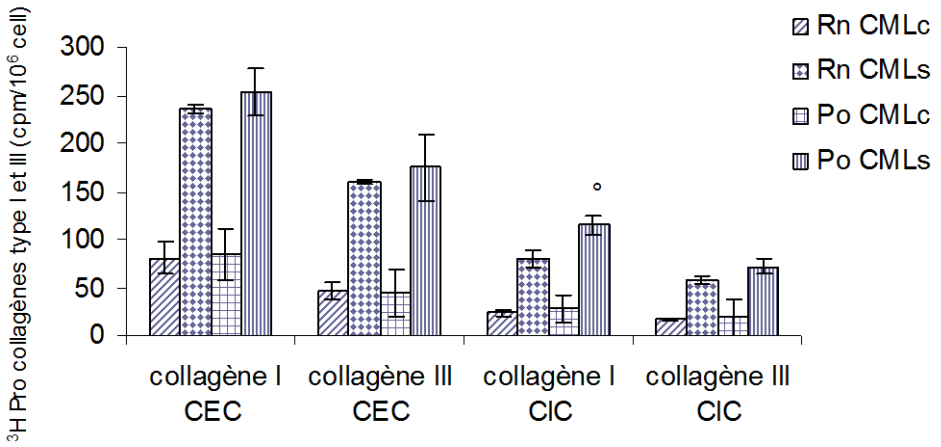


Figure 81 - Incorporation de ^{3}H Pro dans les collagènes I et III des CEC et CIC des CML aortiques de R.n et P.o en culture secondaire aux phénotypes C et S de l'état basal.
L'incorporation de la radioactivité de chaque type de collagène est déterminée par rapport au collagène total marqué et séparé après electrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10% en ses chaînes α1 et α2.
Les valeurs correspondent à la moyenne de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Etat C des CML de P.o vs état C des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o vs état S des CML de R.n
L'analyse statistique entre état C et S a révélé des différences très significatives pour les deux types de collagène et pour les deux espèces ($p < 0.0001$).

B. EFFET DU GLUCOSE A COURT ET LONG TERME

1. *INCUBATION PENDANT 48H (FIG. 82, 83)*

L'incubation des CML contractiles et synthétiques de R.n et de P.o dans un milieu enrichi en glucose pendant 48h, montre une élévation de l'incorporation de proline tritiée dans les deux compartiments, traduisant une activation de synthèse des deux types de collagène étudiés, I et III.

1.1. Etat contractile

Les taux de collagène I et III totaux augmentent significativement ; ils sont respectivement de 56,0 ± 1,1 et 42,8 ± 1,4 % dans les CMLc de R.n ; 66,4 ± 2,5 et 55,2 ± 34 % dans les CML c de P.o.

Entre les deux espèces, l'analyse statistique révèle des différences significatives pour les deux collagènes ($p < 0,01$).

L'incorporation de proline tritiée dans le CEC des CMLc de R.n présente respectivement pour les collagènes I et III les valeurs de 143 ± 18 et 102 ± 12 cpm/10^6 cellules (p : NS). Dans le CIC, nous relevons 69 ± 9 et 56 ± 8 cpm/10^6 cellules ($p < 0,05$). Pour les deux collagènes, les différences entre CEC et CIC sont statistiquement significatives ($p < 0,001$) en faveur du CEC.

Dans les CMLc de P.o, l'incorporation de proline tritiée représentant les collagènes I et III est estimé respectivement à 152 ± 17 et 142 ± 16 cpm/10^6 cellules dans le CEC (p : NS) ; 80 ± 8 et 60 ± 5 cpm/10^6 cellules dans le CIC ($p < 0,001$).

La comparaison interspécifique a révélé une différence significative pour les taux des deux types de collagène ($p < 0,01$) ainsi que pour leur proportion de sécrétion qui augmente sensiblement par rapport à l'état basal. ($p < 0,0001$).

١,٢. *Etat synthétique*

Comparativement à l'état basal, les taux de collagène I et III totaux estimés respectivement à 72,7 ± 6,1 et 66,7 ± 6,9 % dans les CMLs de R.n ; 140,1 ± 9,8 et 77,2 ± 3,9 % dans les CMLs de P.o, sont significativement plus élevés notamment dans les CMLs de P.o.

Dans les CMLs de R.n, l'incorporation de proline tritiée dans les deux compartiments montre une élévation des deux types de collagène, plus accentuée dans le CEC que dans le CIC ($p < 0,05$ pour le coll I ; $p < 0,01$ pour le coll III).

Par ailleurs, nous avons également noté une tendance à l'équivalence entre les deux types de collagène (p : NS dans le CEC ; $p < 0,05$ dans le CIC). En effet, nous avons enregistré dans le CEC respectivement pour le collagène I et III des valeurs de 261 ± 50 et 230 ± 35 cpm/10^6 cellules et dans le CIC des valeurs de 151 ± 33 et 144 ± 29 cpm/10^6 cellules ; ce qui explique la diminution du taux des chaînes $\alpha 2$ par rapport aux chaînes $\alpha 1$ (Tab. XVII) et par conséquent l'élévation du rapport $\alpha 1/\alpha 2$.

Dans les CMLs de P.o, l'incorporation de proline tritiée est également significativement augmentée ($p < 0,0001$). Elle est plus représentée dans le CEC que dans le CIC avec une prédominance du collagène I ($p < 0,001$ dans les deux compartiments). Ainsi, dans le CEC, l'incorporation de proline dans le collagène I atteint 342 ± 31 cpm/10^6 cellules contre 261 ± 50 cpm/10^6 cellules dans les CMLs de R.n ($p< 0,02$). Dans le même compartiment, le collagène III est moins représenté que dans les CMLs de R.n : 186 ± 30 contre 230 ± 35 cpm/10^6 cellules mais la différence statistique n'est pas significative ($p<0,1$).

Dans le CIC, la biosynthèse des collagènes I et III est évaluée respectivement à 327 ± 50 et 184 ± 23 cpm/106 cellules avec une différence très significative en faveur du collagène I. Comparativement aux CMLs de R.n, les différences sont très significatives pour le collagène I et significatives pour le collagène III en faveur des CMLs de Po.

Ces variations sont corrélées à celles des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$.

En définitive, **après une incubation de 48h dans un milieu enrichi en glucose, les CML de R.n et de P.o présentent :**

- Une élévation de l'incorporation de la proline tritiée dans les deux compartiments révélant une augmentation biosynthèse des collagènes I et III aux deux phénotypes C et S.

- Une biosynthèse plus importante à l'état synthétique.

- Une tendance à l'équivalence entre les deux types de collagène qui apparaît dans les CMLc et CMLs de R.n ainsi que dans les CMLc de P.o.

- Une biosynthèse de collagène I plus élevée que celle du collagène III dans les CMLs de P.o.

- L'incorporation de la proline tritiée reste plus importante dans le CEC/CIC, comparativement à l'état basal.

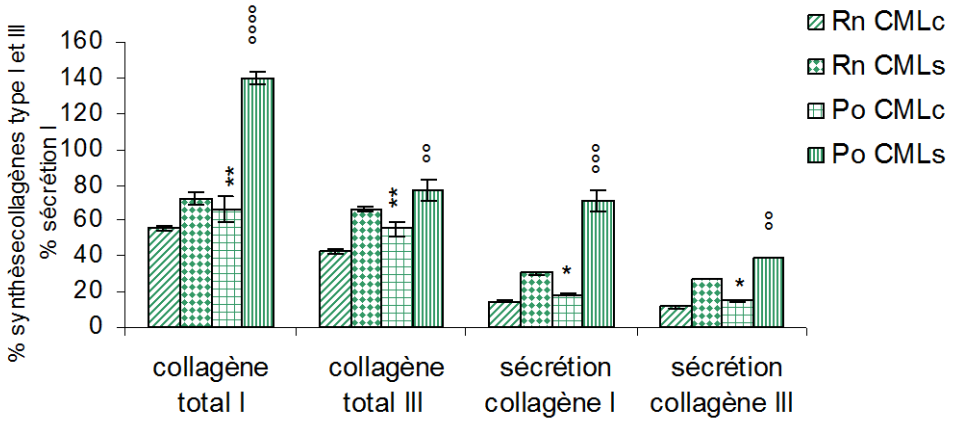


Figure 82 - Effet de concentrations élevées de glucose (15 mM) pendant 48h sur le taux des collagènes I et III et le taux de leur sécrétion par les CML de R.n et P.o en culture secondaire aux phénotypes C et S.

Les valeurs correspondent à la moyenne de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Etat C des CML de P.o vs état C des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o vs état S des CML de R.n
L'analyse statistique entre état C et S a révélé des différences significatives ($p < 0.01$) à très significatives ($p < 0.0001$) en faveur du collagène I pour les deux espèces.

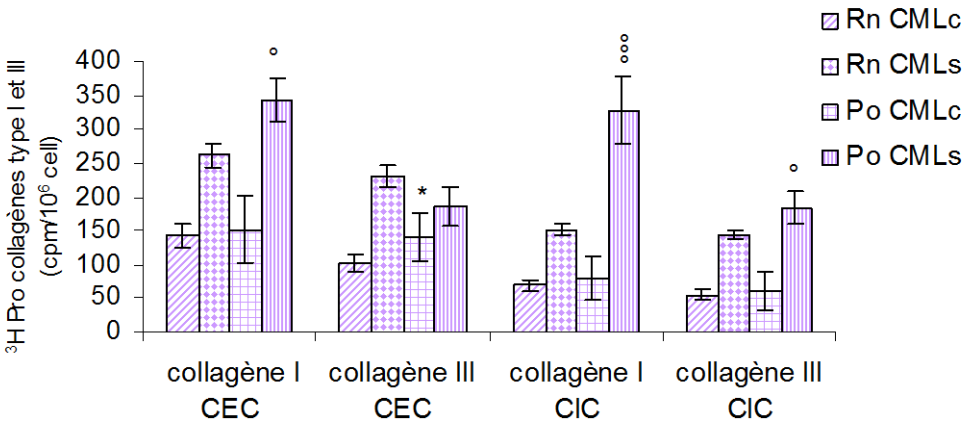


Figure 83 - Effet de concentrations élevées de glucose (15 mM) pendant 48h sur l'incorporation de ^{3}H Pro dans les collagènes I et III contenus dans les CEC et CIC des CML de R.n et P.o en culture secondaire aux états phénotypiques C et S.

Les valeurs correspondent à la moyenne de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Etat C des CML de P.o vs état C des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o vs état S des CML de R.n
L'analyse statistique entre état C et S a révélé des différences très significatives ($p < 0.001$ à 0.0001) en faveur du collagène I dans les deux compartiments et pour les deux espèces.

2. INCUBATION DURANT 4P (FIG. 84, 85)

2.1. Etat contractile

Par rapport aux états contractiles étudiés précédemment (contractile basal, contractile après incubation au glucose de 48h), les résultats correspondant à l'incubation au glucose à long terme indiquent une évolution comparable mais plus exagérée de l'incorporation de la proline tritiée dans les deux compartiments en faveur du collagène I.

Les taux de collagène I et III totaux sont respectivement de 75,1 ± 1,0 et 56,5 ± 1,1 % dans les CMLc de R.n ($p < 0,01$) ; de 116,4 ± 4,3 et 89,0 ± 5,2 % dans les CMLc de P.o ($p < 0,001$). Les différences relevées entre les deux espèces sont très significatives ($p< 0,0001$) pour les deux collagènes.

L'incorporation de proline tritiée contenue dans les collagènes I et III des CMLc de R.n indique respectivement 321 ± 41 et 229 ± 32 cpm/10^6 cellules dans le CEC ; 238 ± 24 et 189 ± 16 cpm/10^6 de cellule dans le CIC ($p < 0,001$ dans les deux compartiments).

Dans les CMLc de P.o, la radioactivité contenue dans les collagènes I et III correspond respectivement à 447 ± 95 et 375 ± 80 cpm/10^6 dans le CEC ; 360 ± 63 et 252 ± 33 cpm/10^6 cellules dans le CIC ($p < 0,001$ dans les deux compartiments).

Dans les CMLc des deux espèces, les différences statistiques relevées entre le CEC et le CIC sont peu significatives pour les deux collagènes.

Le pourcentage de sécrétion des collagènes I et III est statistiquement plus important ($p < 0,01$), toutefois la sécrétion du collagène I est plus marquée que celle du collagène III ($p < 0,01$ pour les CMLc de R.n ; $p < 0,001$ pour les CMLc de Po).

2.2 Etat synthétique

Les taux de collagènes I et III totaux sont fortement augmentés.

Dans les CMLs de R.n, les taux de synthèse des collagènes I et III sont estimés respectivement à 131,1 ± 10,3 et 88,1 ± 4,1% ($p < 0,001$)

Dans les CMLs de P.o, le collagène I est de 167,5 ± 12,6 % ; le collagène III est de 115,1 ± 7,9 % ($p < 0,001$). Nous observons des variations comparables mais plus exagérées que celles relevées dans les CMLs de P.o incubées pendant 48 h dans un milieu hyperglucosé.

Ainsi, nous notons l'augmentation très significative de la biosynthèse des collagènes I et III par rapport au phénotype synthétique basal et après une incubation au glucose de 48h.

Cette élévation du radiomarquage de la proline tritiée est plus accentuée dans le CEC que dans le CIC pour les deux collagènes et les deux espèces étudiées ($p < 0.001$).

L'incorporation de proline tritiée est également en faveur du collagène I qui est plus représenté que le collagène III dans les deux compartiments ($p<0,0001$) et pour les deux espèces ($p<0,0001$). Son taux de sécrétion atteint 81,9 ± 7,6 % dans les CMLs de R.n et 145,0 ± 9,6 % dans les CMLs de P.o.

Ainsi la proline tritiée incorporée dans les collagènes I et III est estimée respectivement à 705 ± 79 et 430 ± 46 cpm/10^6 cellules dans le CEC ($p < 0,0001$) ; à 388 ± 59 et 296 ± 64 cpm/10^6 cellules dans le CIC des CMLs de R.n ($p < 0,01$).

Dans les CMLs de P.o, les incorporations de 3H Pro respectives aux collagène I et III sont équivalentes à 1231 ± 133 et 793 ± 67 cpm/10^6 cellules dans le CEC ($p < 0,001$) ; à 545 ± 67 et 399 ± 46 cpm/10^6 de cellules dans le CIC ($p < 0.001$).

Les comparaisons interspécifiques révèlent des différences significatives pour le collagène I dans les deux compartiments ($p < 0,01$). Pour le collagène III, les différences sont significatives dans le CEC ($p < 0,01$) et peu significatives dans le CIC ($p < 0.05$).

En définitive, **comparativement à l'état basal et à l'incubation au glucose de 48h, celle à long terme révèle :**

- une biosynthèse exagérée des deux collagènes

- une incorporation de proline tritiée plus importante dans le CEC

- une prédominance du collagène I par rapport au collagène III dans les CMLs et c des deux espèces étudiées.

- une plus grande sensibilité des CMLs de P.o après leur incubation à long terme dans du glucose.

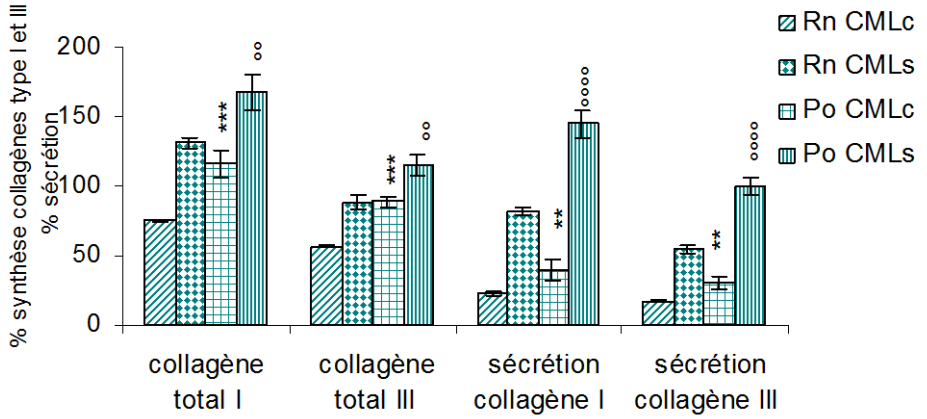


Figure 84 - Effet de concentration élevées de glucose (15 mM) durant 4P sur le taux des collagènes I et III et le taux de leur sécrétion par les CML de R.n et P.o en culture secondaire aux phénotypes C et S.

Les valeurs correspondent à la moyenne de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Etat C des CML de P.o vs état C des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o vs état S des CML de R.n
L'analyse statistique entre état C et S a révélé des différences significatives à très significatives ($p < 0.01$ à 0.0001) en faveur du collagène I pour les deux espèces.

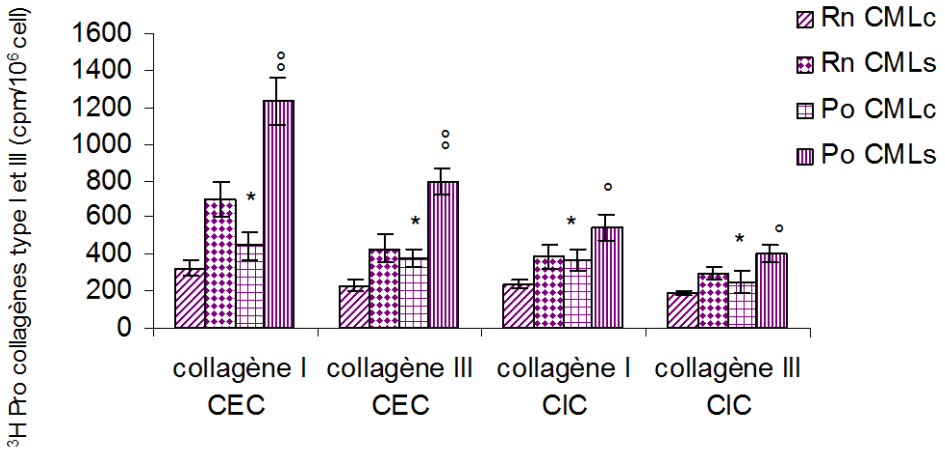


Figure 85 - Effet de concentrations élevées de glucose (15 mM) durant 4P sur l'incorporation de ^{3}H Pro dans les collagènes I et III contenus dans les CEC et CIC des CML de R.n et P.o en culture secondaire aux phénotypes C et S.

Les valeurs correspondent à la moyenne de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Etat C des CML de P.o vs état C des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o vs état S des CML de R.n
L'analyse statistique entre état C et S a révélé des différences significatives à très significatives ($p < 0.01$ à 0.0001) en faveur du collagène I dans les deux compartiments et pour les deux espèces.

C. EFFET DU DIABETE (FIG. 86, 87)

1. ETAT CONTRACTILE

A l'état diabétique, nous assistons à une exagération des synthèses des collagènes I et III. Les taux de collagènes I et III totaux sont respectivement de :

107,6 ± 8,6 et 68,2 ± 3,9% dans les CMLc de R.n diabétique ; 179,6 ± 7,2 et 126,7 ± 6,5% dans les CMLc de P.o diabétique.

Comme pour l'incubation au glucose à long terme, l'exagération des synthèses se fait en faveur du collagène I par rapport au collagène III.

Par ailleurs, la forte concentration des deux types de collagène est observée dans les deux compartiments avec une prédominance dans le CEC ($p < 0,0001$ pour collagène I et III). En effet, dans ce compartiment, les CMLc de R.n et de P.o diabétique présentent respectivement pour le collagène I : 849 ± 146 et 1409 ± 67 cpm/10^6 cellules ; pour le collagène III : 547 ± 126 et 981 ± 59 cpm/10^6 de cellules. Par rapport aux états contractiles de base et après incubation au glucose à court et long terme, les différences statistiques sont significatives pour les deux types de collagène.

2. ETAT SYNTHETIQUE

Les CMLs de R.n et de P.o diabétique présentent une exagération des synthèses de collagènes I et III statistiquement très significatives comparées aux stades précédemment étudiés (basal, + G 48h, + G 4P).

Nous relevons des taux de collagène I et III totaux respectivement équivalents à : 200.9 ± 14.9 et 135.2 ± 10.6 % dans les CMLs de R.n diabétique ; 290,8 ± 12,7 et 167,6 ± 6,5 % dans les CMLs de P.o diabétique.

Dans les CMLs de R.n et de P.o diabétique, l'incorporation du pool de proline tritiée dans le collagène I du CEC est respectivement égale à 1610 ± 227 et 2351 ± 116 cpm/10^6 ($p < 0,001$). Celle du collagène III est de 1005 ± 115 et 1410 ± 83 cpm/10^6 ($p < 0,001$).

De même qu'à l'état contractile, nous observons une prédominance du collagène I par rapport au collagène III et les différences sont très significatives dans les deux types de cellules ($P< 0,0001$).

Dans le CIC, le collagène I et le collagène III sont également très augmentés mais dans une moindre mesure comparativement au CEC ($p< 0,0001$). Ainsi pour le collagène I, nous avons relevé dans ce compartiment : 982 ± 176 cpm/10^6 cellules dans les CMLs de R.n diabétique et 1503 ± 143 cpm/10^6 cellules dans les CMLs de P.o diabétique ($p < 0,01$).

Pour le collagène III, les résultats indiquent que le pool de proline tritiée dans les CMLs de R.n et de P.o diabétique est respectivement de 714 ± 89 et 834 ± 67 cpm/10^6 (p : NS).

Cette exagération de synthèse des collagènes I et III est donc observée dans toutes les conditions de pathologie expérimentale, mais elle est plus marquée dans les CMLs de P.o diabétique où les différences relevées et comparées aux CMLs du R.n DID sont significatives notamment pour le Collagène I

En conclusion, **comparativement à l'état basal et aux effets de glucose à court et long terme, les CMLs de R.n DID et de P.o DNID présentent une synthèse de collagènes I et III fortement augmentée. Une importante accumulation intéresse les deux compartiments mais elle prédomine dans le CEC et favorise le collagène I dont le taux de sécrétion atteint 253,9 ± 37,2 % vs 175,6 ± 12,0 % dans les CMLs de R.n DID ($p < 0,001$).**

Enfin, ce sont les CMLs de P.o DNID qui semblent être les plus sensibles aux effets du glucose et à l'impact du diabète puisqu'elles présentent les dérégulations les plus importantes.

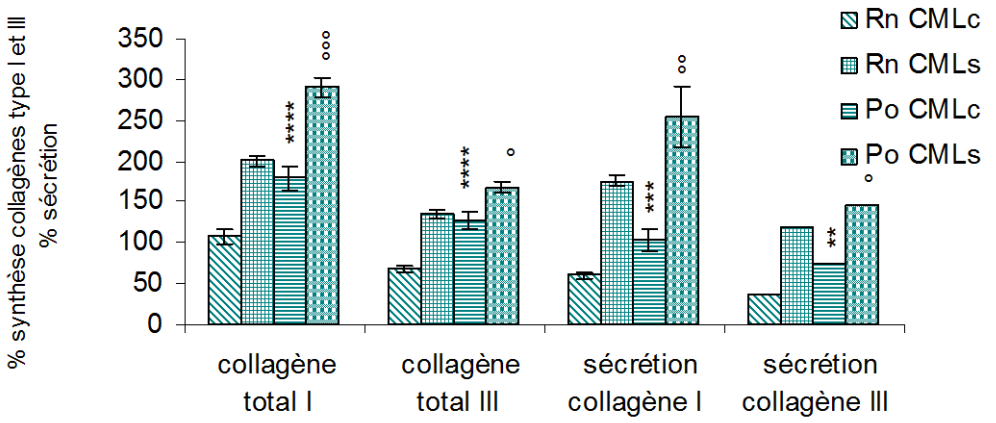


Figure 86 - Taux totaux des collagènes I et III et taux de leur sécrétion par les CML de R.n et P.o diabétiques mises en culture secondaire aux phénotypes C et S.

Les valeurs correspondent à la moyenne de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Etat C des CML de P.o vs état C des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o vs état S des CML de R.n
L'analyse statistique entre état C et S a révélé des différences significative à très significatives ($p < 0.01$ à 0.001) pour les deux types de collagène et pour les deux espèces.

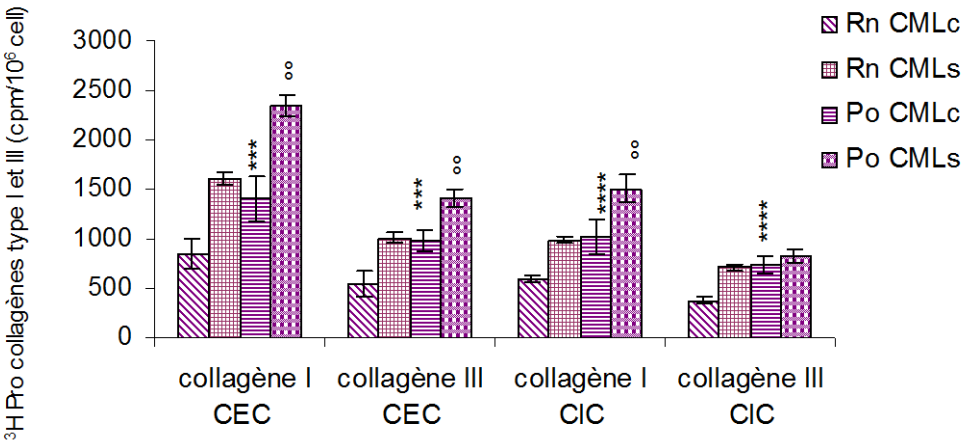


Figure 87 - Incorporation de ^{3}H Pro dans les collagènes I et III contenus dans les CEC et CIC des CML de R.n et P.o Diabétiques en culture secondaire aux phénotypes C et S.

Les valeurs correspondent à la moyenne de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Etat C des CML de P.o vs état C des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o vs état S des CML de R.n
L'analyse statistique entre état C et S a révélé des différences très significatives ($p < 0.001$) en faveur du collagène I dans les deux compartiments et pour les deux espèces.

D. INFLUENCE DE L'INSULINE PENDANT 48H (FIG. 88, 89, 90, 91)

Nous avons étudié l'effet de l'insuline pendant 48h sur des CML synthétiques de R.n et de P.o dans deux conditions expérimentales : l'Incubation dans un milieu enrichi en glucose durant 4 passages et l'état de diabète.

L'intégration des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ a montré une augmentation des rapports $\alpha 1/\ \alpha 2$ dans les deux compartiments et donc une diminution sensible du taux de chaînes $\alpha 2$ spécifiques du collagène I par rapport aux chaînes $\alpha 1$.

Nous avons observé une évolution comparable dans le radiomarquage. Ainsi dans les deux compartiments des CMLs incubées à long terme, l'incorporation de proline tritiée indique une diminution significative des collagènes I et III. Cette diminution est plus accentuée pour le collagène I (Tab. en annexe).

Les taux de collagène I totaux des CMLs de R.n et de P.o incubées pendant 4 passages atteignent respectivement 100n4 ± 8,2 et 126,0 ± 6,4 % contre 131,1 ± 10,3 et 167,5 ± 12,6% des témoins correspondants ($p < 0,01$; $p < 0,001$).

Les taux de collagène III respectifs sont de 82,7 ± 4,7 et 103,3 ± 5,2% contre 88,1 ± 4,1 et 115,1 ± 7,9 % des témoins correspondants ($p < 0,05$; $p < 0,001$).

Dans les CMLs de R.n et de P.o diabétiques, l'insuline induit une diminution plus sensible des taux de collagène I qui sont respectivement de 122,5 ± 4,7 et 135,3 ± 14,2 % ($p< 0,001$). Les taux de collagène III atteignent respectivement dans les CMLs de R.n et de P.o 90,1 ± 7,4% et 110,5 ± 6,6% contre 135,2 ± 10,6 et 167,5 ± 12,6% chez les témoins correspondants ($p < 0,001$).

De plus, les résultats indiquent que sous l'effet de l'insuline, la diminution plus importante du collagène I par rapport au collagène III induit un rapprochement entre les taux des deux collagènes notamment dans le CEC même si les différences statistiques restent significatives (Tab. XIX en annexe).

Ainsi les taux de collagène I et III dans le CEC sont respectivement de :

- 38,1 et 47,4% dans les CMLs de R.n + G4P+I *vs* 44,3 et 72,7 %
- 43,1 et 52,0% dans les CMLc de P.o + G4P+I *vs* 54,5 et 84,2
- 48,1 et 55,2% dans les CMLs diabétiques de R.n *vs* 72,8 et116,4
- 61,2 et 69,9% dans les CMLs diabétiques de P.o *vs* 84,0 et 140,3 %.

Il faut cependant noter que malgré l'effet favorable de l'insuline qui ramène les taux de collagène I et III à des taux nettement inférieurs à ceux relevés après incubation au glucose durant 4P et à l'état diabétique, ceux-ci restent supérieurs aux taux normaux et les différences sont très significatives.

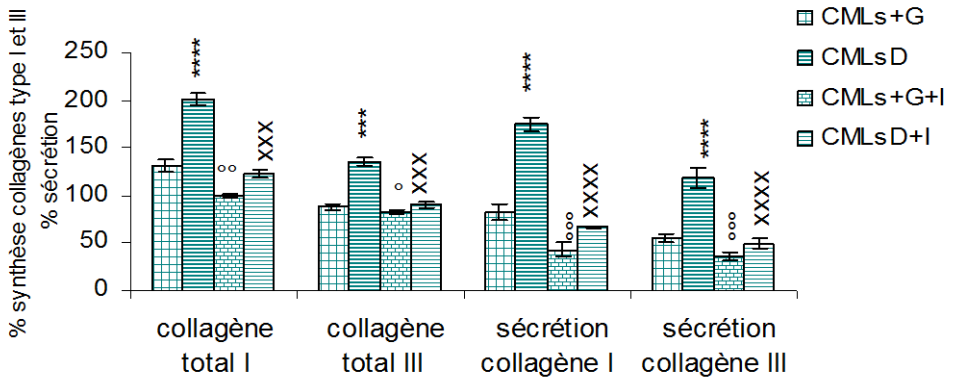


Figure 88 - Influence de l'insuline à 4 mU/ml pendant 48h sur les taux des collagènes I et III et le taux de leur sécrétion par les CML de R.n en culture incubées durant 4P dans du glucose 15 mM et celles provenant de R.n diabétique au phénotype synthétique.

Les valeurs sont les moyennes de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Etat Diab vs + G 4P
(°) Influence de l'insuline après incubation à long terme vs témoins correspondants
(x) Influence de l'insuline à l'état Diab vs témoins correspondants

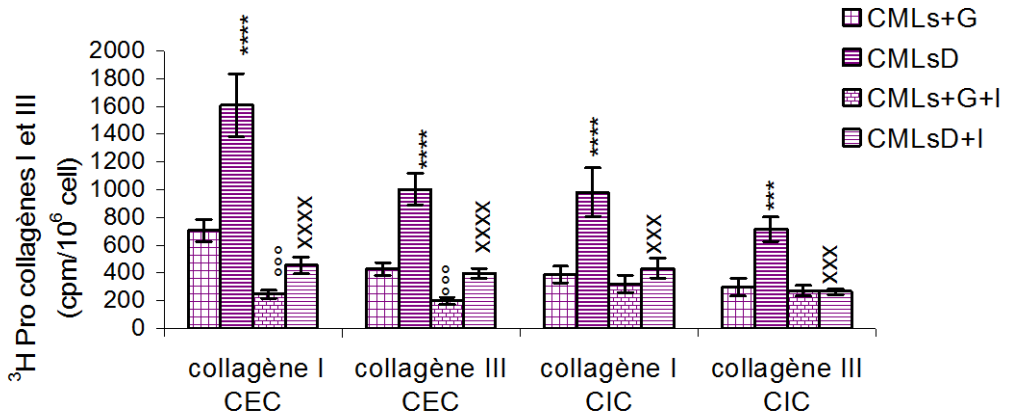


Figure 89 -Influence de l'insuline à 4 mU/ml pendant 48h sur l'incorporation de ^{3}H Pro dans les collagènes I et III contenus dans les CEC et CIC des CML de de R.n en culture incubées durant 4P dans un milieu enrichi en glucose 15 mM et celles provenant de R.n diabétique, au phénotype synthétique

Les valeurs sont les moyennes de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Etat Diab vs + G 4P
(°) Influence de l'insuline après incubation à long terme vs témoins correspondants
(x) Influence de l'insuline à l'état Diab vs témoins correspondants

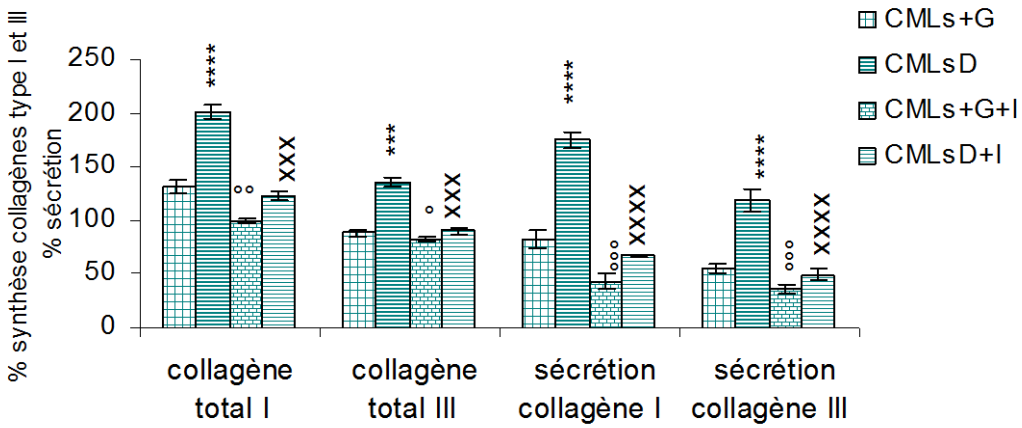


Figure 90 - Influence de l'insuline à 4 mU/ml pendant 48h sur les taux des collagènes I et III et le taux de leur sécrétion par les CML aortiques de P.o en culture incubées durant 4P dans un milieu enrichi en glucose 15 mM et celles provenant de P.o diabétique au phénotype synthétique.

Les valeurs sont les moyennes de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Etat Diab vs + G 4P
(°) Influence de l'insuline après incubation à long terme vs témoins correspondants
(x) Influence de l'insuline à l'état Diab vs témoins correspondants

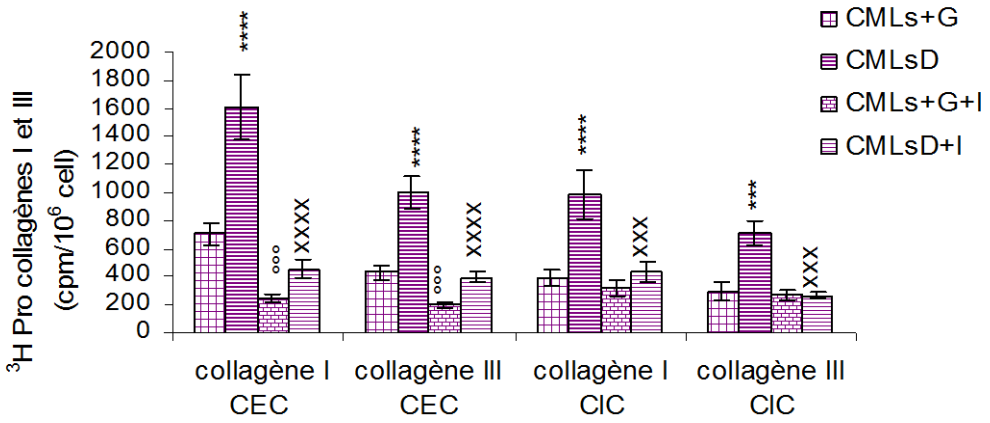


Figure 91 - Influence de l'insuline à 4 mU/ml pendant 48h sur l'incorporation de ^{3}H Pro dans les collagènes I et III contenus dans les CEC et CIC des CML de R.n en culture incubées durant 4P dans un milieu enrichi en glucose 15 mM et celles provenant de R.n diabétique au phénotype synthétique

Les valeurs sont les moyennes de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Etat Diab vs + G 4P
(°) Influence de l'insuline après incubation à long terme vs témoins correspondants
(x) Influence de l'insuline à l'état Diab vs témoins correspondants

E. CONCLUSION (FIG. 92, 93, 94, 95, 96, 97)

L'estimation des biosynthèses et des taux de collagène I et III montre que :

- Les collagènes I et III sont plus représentés dans les CMLs que dans les CMLc des deux espèces étudiées.

- Le collagène I est plus représenté que le collagène III aux deux états phénotypiques et dans les CML des deux espèces étudiées.

- Après une incubation au glucose de 48h, nous notons une synthèse accrue de collagène I et III. Un rapprochement entre les taux des deux types de collagène est observé dans les CMLc de R.n, et de P.o ainsi que dans les CMLs de R.n ; les CMLs de P.o présentent plus de collagène I que de collagène III (140 % contre 77,3 %).

- L'incubation des CML dans un milieu enrichi en glucose durant 4P montre une élévation très significative des collagènes I et III notamment à l'état synthétique où on relève également une élévation du collagène I par rapport au collagène III.

- Dans les CML d'animaux diabétiques, à l'état synthétique notamment, les résultats indiquent une exagération des synthèses et sécrétion des collagènes I et III et du collagène I par rapport au collagène III. Une plus grande sensibilité apparaît dans les CMLs de P.o.

- En présence d'insuline, les taux de collagène I et III diminuent nettement mais restent toutefois supérieurs aux taux normaux. La diminution du taux de collagène I est plus rapide que celle du collagène III, ce qui rapproche le taux du collagène I à celui du collagène III.

- L'influence de l'insuline est plus marquée dans les CMLs de P.o.

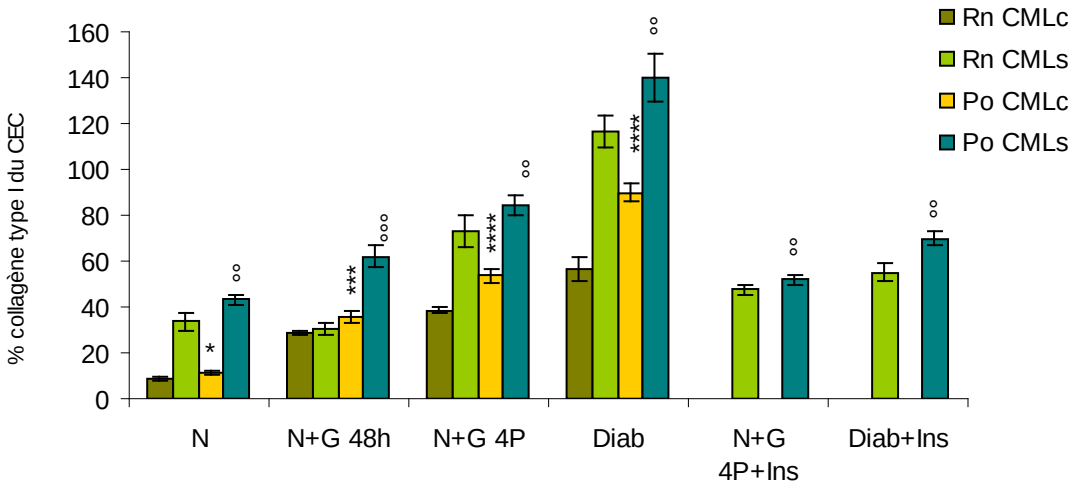


Figure 92 - Taux de collagène I dans le compartiment extracellulaire des CML de R.n et P.o en culture secondaire dans les différentes conditions expérimentales étudiées aux phénotypes C et S.

Les valeurs sont les moyennes de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Etat C des CML de P.o dans les différentes conditions expérimentales vs états C correspondants des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o dans les différentes conditions expérimentales vs états S correspondants des CML de R.n
L'analyse statistique entre état C et S a révélé des différences très significatives pour les deux espèces ($p < 0.001$ à 0.0001) sauf pour la 2ème condition expérimentale (+ G 48h) des CML de R.n où la différence statistique n'est pas significative .

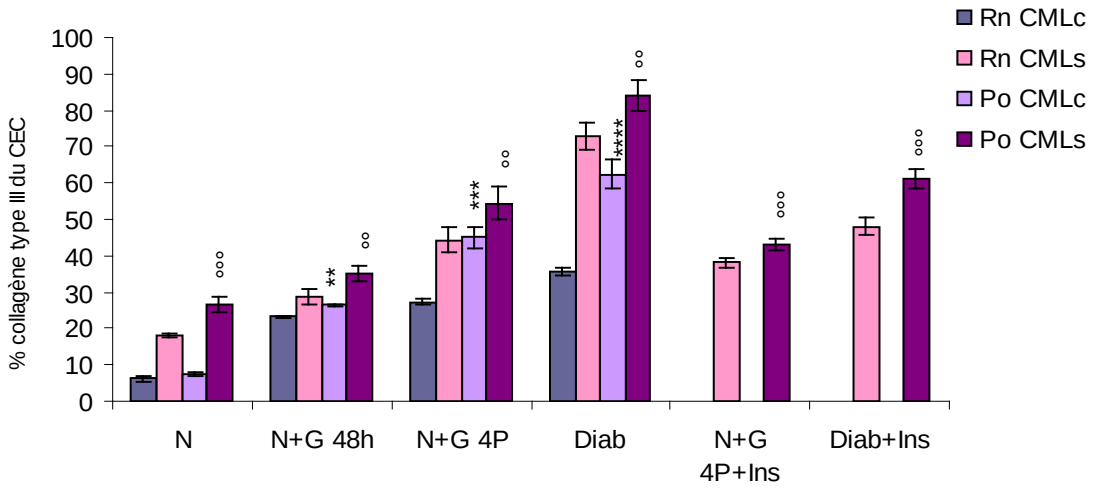


Figure 93 - Taux de collagène III dans le compartiment extracellulaire des CML aortiques de R.n et P.o en culture secondaire dans les différentes conditions expérimentales étudiées aux phénotypes C et S.

Les valeurs sont les moyennes de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Etat C des CML de P.o dans les différentes conditions expérimentales vs états C correspondants des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o dans les différentes conditions expérimentales vs états S correspondants des CML de R.n
L'analyse statistique entre état C et S a révélé des différences significatives à très significatives pour les deux espèces ($p < 0.01$ à 0.0001) sauf pour la 2ème condition expérimentale (+ G 48h) des CML de R.n où la différence statistique est peu significative .

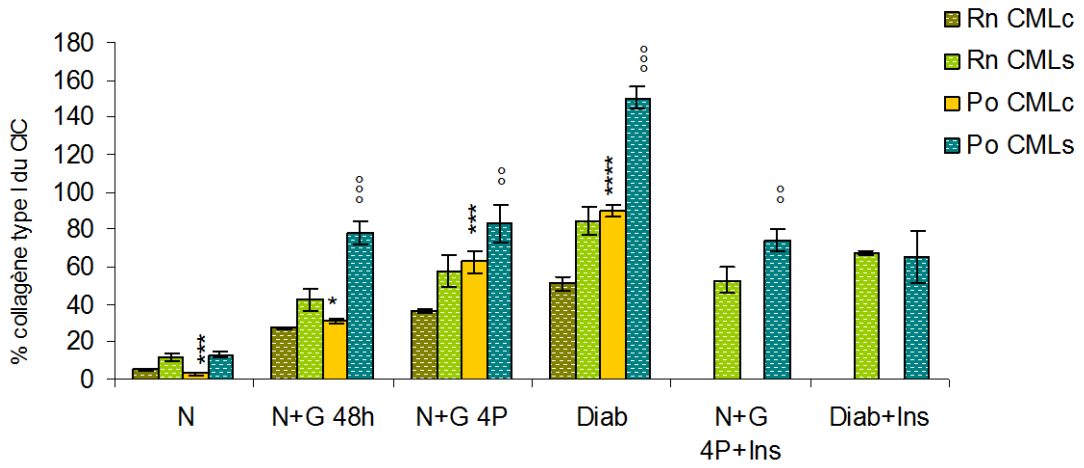


Figure 94 - Taux de collagène I dans le compartiment intracellulaire des CML de R.n et P.o en culture secondaire dans les différentes conditions expérimentales étudiées aux phénotypes C et S.

Les valeurs sont les moyennes de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Etat C des CML de P.o dans les différentes conditions expérimentales vs états C correspondants des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o dans les différentes conditions expérimentales vs états S correspondants des CML de R.n
L'analyse statistique entre état C et S a révélé des différences significatives à très significatives pour les deux espèces ($p < 0.01$ à 0.0001)

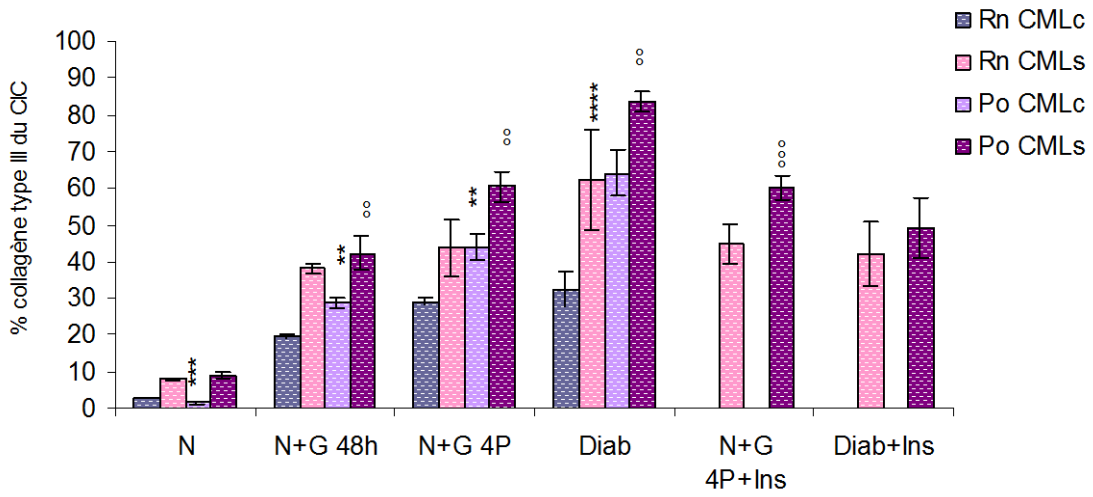


Figure 95 - Taux de collagène III dans le compartiment intracellulaire des CML de R.n et P.o en culture secondaire dans les différentes conditions expérimentales étudiées aux phénotypes C et S.

Les valeurs sont les moyennes de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Etat C des CML de P.o dans les différentes conditions expérimentales vs états C correspondants des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o dans les différentes conditions expérimentales vs états S correspondants des CML de R.n
L'analyse statistique entre état C et S a révélé des différences significatives à très significatives pour les deux espèces ($p < 0.01$ à 0.0001) sauf pour la 2ème condition expérimentale (+ G 48h) des CML de R.n où la différence statistique est peu significative .

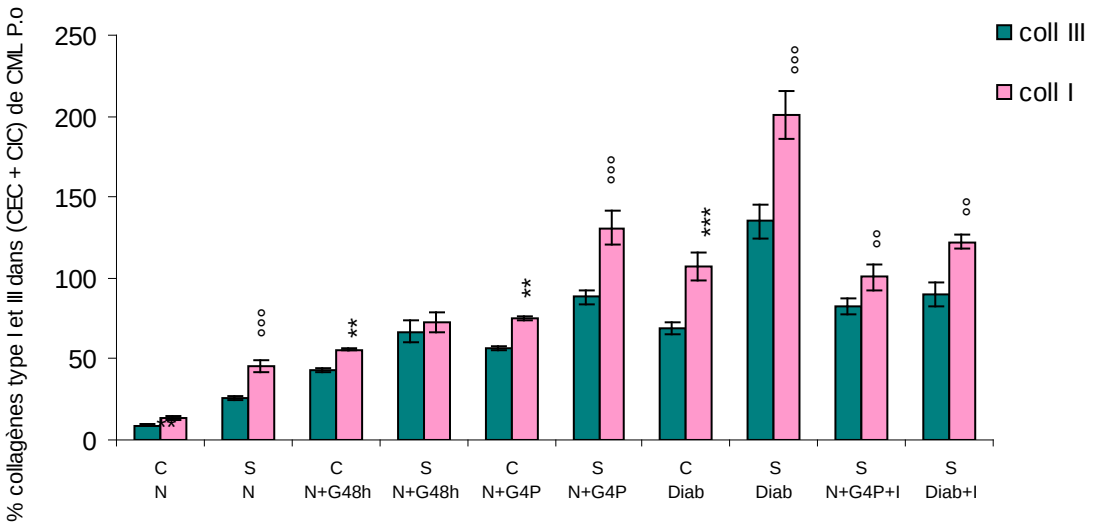


Figure 96 - Taux des collagènes I et III dans les CML de R.n dans les différentes conditions expérimentales étudiées aux phénotypes C et S.

Les valeurs sont les moyennes de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Coll I vs Coll III à l'état C
(°) Coll I vs Coll III à l'éta

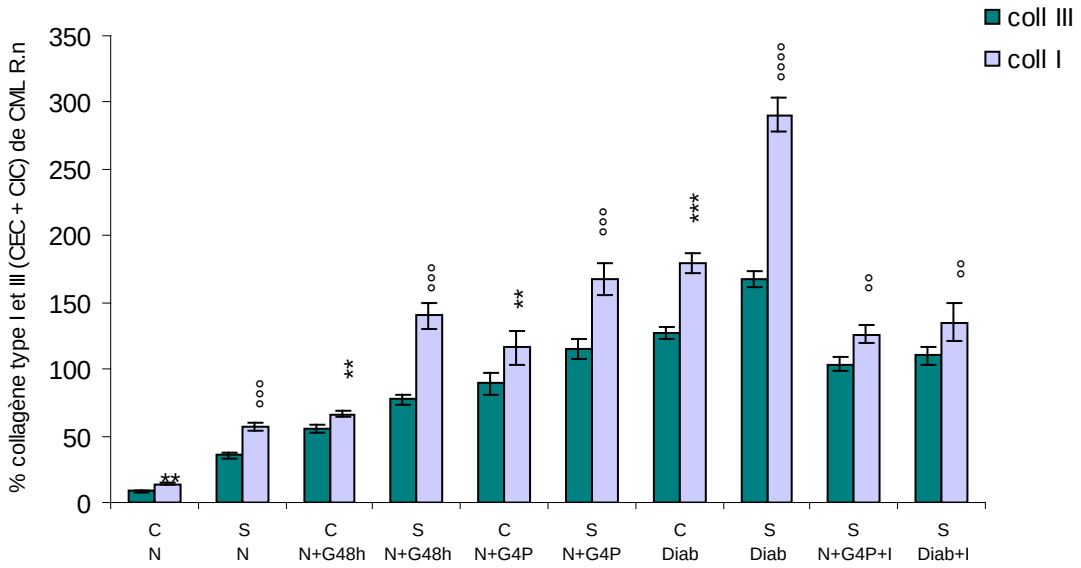


Figure 97 - Taux des collagènes I et III dans les CML de P.o dans les différentes conditions expérimentales étudiées aux phénotypes C et S.

Les valeurs sont les moyennes de six déterminations affectées de l'écart type.
(*) Coll I vs Coll III à l'état C
(°) Coll I vs Coll III à l'état S

CHAPITRE IV :

EVALUATION DES FRACTIONS DE CHOLESTEROL LIBRE, TOTAL ET ESTERIFIE DANS LES CML AORTIQUES EN CULTURE SECONDAIRE

CHOLESTEROL INTRACELLULAIRE (Tab. XXIII)

Le cholestérol libre et total intracellulaire, exprimé en µg/10^6 cellules, est déterminé par méthode enzymatique après action de la cholestérol oxydase, la peroxydase et l'ester hydrolase. Le cholestérol estérifié est déduit de la différence entre cholestérol total et cholestérol libre.

Cette partie de résultats a porté sur l'évaluation de ces fractions de cholestérol dans les CML en culture secondaire de R.n et P.o à l'état basal contractile et synthétique, suite aux effets de concentrations élevées de glucose à court et long terme ainsi qu'à ceux des diabètes (DNID et DID). Dans une dernière partie, nous avons étudié l'influence de l'insuline sur les CML synthétiques affectées par les effets de glucose 15 mM à long terme et celles provenant d'animaux diabétiques.

I. ETAT BASAL (FIG. 98)

Pour les deux espèces étudiées, les fractions de CL et de CE sont plus élevées dans les CML synthétiques que contractiles.

Pour le CL, nous avons relevé respectivement dans les CMLs de R.n et de P.o : 6,0 ±1,7 µg et 9,9 ± 1,7 µg /10^6 cellules contre 3,4 ± 0,7 µg et 4,9 ± 0,6 µg /10^6 cellules dans les CMLc ($p < 0,01$).

Pour le CE, nous avons enregistré à l'état synthétique comparativement à l'état contractile : 4,4 ±1,5 µg *vs* 1,8 ± 0,4 µg /10^6 cellules dans les CMLs de R.n ($p < 0,01$) et 2,4 ± 1,1 µg *vs* 15 µg / 10^6 cellules dans les CMLs de P.o ($p < 0,05$).

L'étude interspécifique indique à l'état contractile plus de CL dans les CMLc de P.o (X 1,44 ; $p < 0,01$), une concentration comparable en CE (P : NS) et peu de différences statistiques entre les rapports CL/CE ($p < 0,02$).

A l'état synthétique, les CML de P.o présentent plus de CL (X 1,5 ; $p < 0,02$) et moins de CE (X 1,83 ; $p < 0,01$) que les CMLs de R.n. Le rapport CL/CE est alors plus élevé dans les CMLs du P.o (5,4 contre 1,4 dans les CMLs du R.n ; $p < 0,001$).

Le CT est donc plus élevé à l'état synthétique qu'à l'état contractile (10,4 ± 3,1 µg *vs* 5,2 ± 0,3 µg /10^6 cellules dans les CML de R.n ($p < 0,01$) ; 12,3 ± 0,9 µg *vs* 6,4 ± 0,7 µg /10^6 cellules dans les CML de P.o ($p < 0,001$). Il est également plus élevé dans les CMLs de P.o mais statistiquement non significatif comparativement aux CMLs de R.n.

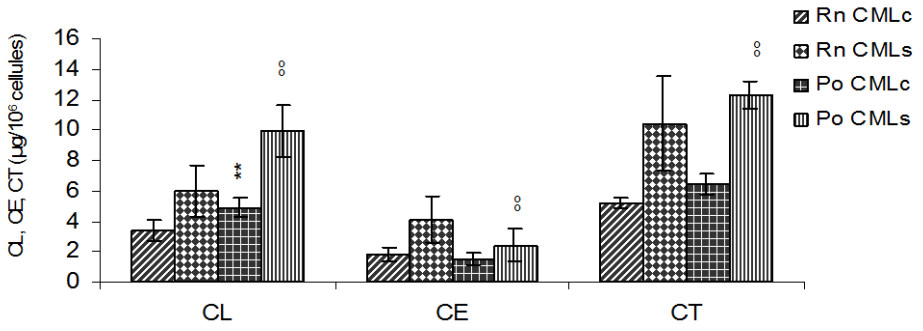


Figure 98 - Evaluation des fractions de cholestérol (libre, estérifié et total) dans les CML de R.n et P.o en culture secondaire aux phénotypes contractile et synthétique de l'état basal.

CL : cholestérol libre ; CE : cholestérol estérifié ; CT : cholestérol total

Le CL, CE et CT sont estimés dans les CML aortiques en culture dans les groupes témoins normaux. Les valeurs sont les moyennes de 7 déterminations affectées de l'écart type. Les différences entre états C et états S sont statistiquement significatives. (*) Etat C des CML de P.o ***vs*** état C des CML de R.n. (°) Etat S des CML de P.o ***vs*** état S des CML de R.n

TABLEAU XXIII

EVALUATION DES FRACTIONS DE CHOLESTEROL LIBRE (CL), ESTERIFIE (CE) ET TOTAL (CT) CONTENUS DANS LES CML DE R.n ET P.o, DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES

R.n

	Etat	cholestérol libre ($\mu g/10^6$ cellules)		Cholestérol estérifié ($\mu g/10^6$ cellules)		Cholestérol total ($\mu g/10^6$ cellules)		CL / CE	
N	C	3,4 ± 0,7		1,8 ± 0,4		5,2 ± 0,3		2,1 ± 0,8	
	S	6,0 ± 1,7		4,4 ± 1,5		10,4 ± 3,1		1,4 ± 0,4	
N+G48h	C	5,0 ± 1,0	°°	3,4 ± 1,3	°°	8,4 ± 2,2	°°	1,7 ± 0,5	°
	S	8,7 ± 0,7	**	4,5 ± 0,3		13,2 ± 0,7	*	1,9 ± 0,2	*
N+G4P	C	8,7 ± 1,1	°°°°	5,6 ± 0,8	°°°	14,2 ± 1,7	°°°°	1,6 ± 0,2	
	S	23,0 ± 4,9	***	11,4 ± 1,1	****	33,5 ± 4,2	****	2,1 ± 0,1	
Diab	C	16,3 ± 1,6	°°°	9,7 ± 0,9	° °°°	25,9 ± 1,5	°°°°	1,7 ± 0,3	°°°
	S	40,5 ± 5,4	**	15,4 ± 2,6	**	55,7 ± 6,2	***	2,7 ± 0,5	*
N+G4P+Ins	S	15,7 ± 2,6	▫▫ xxx	5,6 ± 0,8	▫▫▫▫ x	20,9 ± 2,9	▫▫ xxx	2,9 ± 0,9	▫▫ xxx
Diab+Ins	S	24,0 ± 2,6	▫▫▫ xxxx	4,7 ± 0,7	▫▫▫▫	28,7 ± 3,1	▫▫▫▫ xxx	5,2 ± 0,7	▫▫▫ xxxx

P.o

	Etat	cholestérol libre ($\mu g/10^6$ cellules)		Cholestérol estérifié ($\mu g/10^6$ cellules)		Cholestérol total ($\mu g/10^6$ cellules)		CL / CE	
N	C	4,9 ± 0,6		1,5 ± 0,4		6,4 ± 0,7		3,5 ± 1,1	
	S	9,9 ± 1,7		2,4 ± 1,1		12,3 ± 0,9		5,4 ± 11,5	
N+G48h	C	5,8 ± 0,5	°	3,3 ± 0,5	°°°°	9,4 ± 1,2	°°	1,9 ± 0,3	°°
	S	12,2 ± 1,4	*	4,7 ± 0,5	**	16,9 ± 1,5	****	2,6 ± 0,4	**
N+G4P	C	13,4 ± 2,66	°°°	7,2 ± 1,5	°°	20,6 ± 4,0	°°°	1,9 ± 0,2	
	S	25,9 ± 2,8	****	13,0 ± 0,9	****	39,3 ± 3,5	****	2,1 ± 0,1	**
Diab	C	29,9 ± 3,3	°°°	13,2 ± 0,5	°°°°	45,2 ± 1,3	°°°°	2,4 ± 0,1	
	S	42,9 ± 3,0	****	22,0 ± 1,6	****	63,3 ± 3,5	****	1,9 ± 0,2	**
N+G4P+Ins	S	18,2 ± 1,6	▫▫▫▫ xxxx	3,0 ± 0,5	▫▫▫▫	21,6 ± 1,4	▫▫▫▫ xxxx	6,2 ± 1,1	▫▫▫▫ xx
Diab+Ins	S	23,6 ± 0,7	▫▫▫▫ xxxx	2,4 ± 0,4	▫▫▫▫	26,4 ± 1,6	▫▫▫▫ xxxx	10,1 ± 1,7	▫▫▫▫ xx

Chaque fraction de cholestérol est exprimée en $\mu g/10^o$ cellules
La fraction de CE est déduite de la différence entre les deux autres fractions (CT - CL)
Les valeurs sont les moyennes de 7 déterminations ± l'écart type
N : CML de Rattus norvegicus (R,n) et Psammomys obesus (P,o) normaux
N + G 48h : CML de R.n et P.o normaux en présence de glucose 15 mM pendant 48 heures
N + G 4P : CML de R.n et P.o normaux enprésence de glucose 15 mM durant 4 passages
Diab : CML de R.n et P.o diabétiques
N + G 4P + Ins : influence de l'insuline (4mU/ml) pendant 48h sur les CMLs incubées à long terme dans un milieu hyperglucosé à 15mM
Diab + Ins : influence de l'insuline à 4 mU/ml sur les CMLs de Diab pendant 48h

(°) Etat C de Diab ***vs*** état C ± G 4P ***vs*** état C ± G 48h ***vs*** état basal C
(*) Etat S de Diab ***vs*** état S ± G 4P ***vs*** état S ± G 48h ***vs*** état basal S
(▫) influence de l'insuline ***vs*** témoins correspondants
(x) influence de l'insuline ***vs*** état synthétique basal

II. EFFET DU GLUCOSE PENDANT 48H ET 4 PASSAGES (FIG. 99, 100)

A. INCUBATION DE 48H

La présence d'une concentration élevée de glucose dans le milieu d'incubation durant 48h augmente significativement le CL dans les CMLc de R.o et de P.o comparativement à l'état basal.

A l'état synthétique, les CML de P.o montrent une plus grande activité cholestérogénique que celles de R.n. En effet, nous relevons pour le CL 12,2 ± 1,4 µg contre 8,7 ± 0,7 µg /10^6 cellules dans les CML de R.n ($p < 0,01$). Le CE augmente également dans les CML de P.o ($p < 0,01$) alors qu'il est peu modifié dans les CMLs de R.n (p : NS).

Le rapport CL/CE diminue aux deux états des cellules ; les différences statistiques sont significatives dans les CMLs de P.o et peu significatives dans les CMLs de R.n.

Entre les deux espèces, les moyennes des rapports sont non significatives à l'état C et peu significatives à l'état S ($p < 0,02$). Le CT est donc statistiquement plus élevé dans les CMLs de P.o : 16,9 ± 1,5 µg/10^6 cellules contre 13,2 ± 0,7 µg dans les CMLs de R.n ($p < 0,01$).

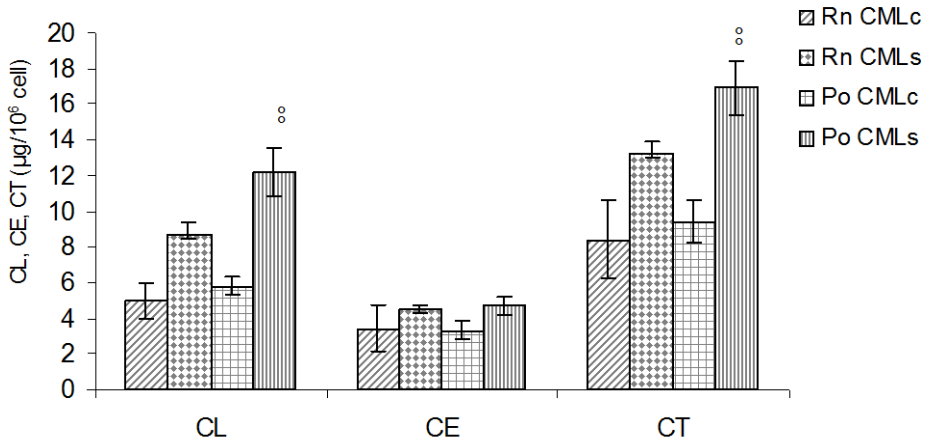


Figure 99 - Evaluation des fractions de CL, CE et CT dans les CML de R.n et P.o en culture secondaire aux phénotypes C et S après une incubation de 48h dans un milieu enrichi en glucose 15 mM.

Les valeurs sont les moyennes de 7 déterminations affectées de l'écart type. Les différences entre états C et états S sont statistiquement significatives

(*) Etat C des CML de P.o ***vs*** état C des CML de R.n

(°) Etat S des CML de P.o ***vs*** état S des CML de R.n

B. INCUBATION A LONG TERME

Comparativement à l'incubation de 48h, l'effet de glucose durant 4P, accentue l'accumulation de CL et de CE notamment à l'état synthétique ($p < 0,001$). Le rapport CL/CE est peu modifié dans les CMLs de R.n (2,1 ± 0,1 *vs* 1,9 ± 0,2), il diminue dans les CMLs de P.o (2,1 ± 0,1 *vs* 2,6 ± 0,4 : $p < 0,01$) ce qui indique une accumulation plus importante de CL par rapport au CE.

Au phénotype synthétique, le cholestérol total atteint respectivement dans les CMLs de R.n et de P.o 33,5 ± 4,2 µg et 39,3 ± 3,5 µg/10^6 cellules.

La comparaison interspécifique montre, à l'état contractile, des différences statistiquement significatives pour tous les paramètres étudiés ($p < 0,01$).
A l'état synthétique, les différences sont peu significatives pour le CL qui est égal à 23,0 ± 4,9 µg /10^6 cellules dans les CMLs de R.n et 25,9 ± 2,8 µg/10^6 cellules dans les CMLs de P.o. Pour les autres fractions (CE et CT), les différences se sont révélées significatives ($p < 0,01$).

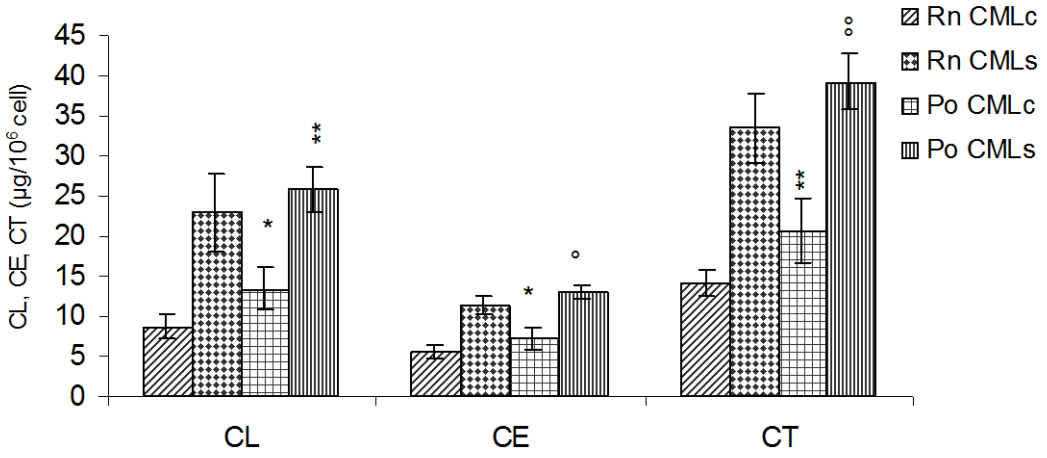


Figure 100 - Evaluation des fractions de CL, CE et CT dans les CML de R.n et P.o en culture secondaire aux phénotypes C et S après une incubation de 4P dans un milieu enrichi en glucose 15 mM.
Les valeurs sont les moyennes de 7 déterminations affectées de l'écart type. Les différences entre états C et états S sont statistiquement significatives
(*) Etat C des CML de P.o ***vs*** état C des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o ***vs*** état S des CML de R.n

III. EFFET DES DIABETES NID ET ID (FIG. 101)

Dans les CML des animaux diabétiques nous avons relevé, aux deux états phénotypiques, des troubles de régulation du cholestérol plus importants que ceux observés après l'incubation au glucose à long terme ($p < 0,001$ à 0,0001).

A l'état contractile, les CML de P.o montrent une plus grande sensibilité que celles de R.n laquelle se traduit par une accumulation plus marquée des trois fractions de cholestérol. En effet, les résultats indiquent 29,9 ± 3,3 µg de CL contre 16,3 ± 1,6 ($p < 0,0001$) et 13,2 ± 0,5 µg de CE contre 9,7 ± 0,9 µg/10^6 cellules. Le CT est évalué à 45,2 ± 1,6 *vs* 25,9 ± 1,5 µg/10^6 cellules. A l'état synthétique, la fraction de CL est comparable entre les deux espèces : 40,5 ± 5,4 µg/10^6 dans les CML de R.n *vs* 42,9 ± 3,0 µg/10^6 cellules dans les CML de P.o.

Le CE est significativement plus important dans les CML de P.o : 22,0 ± 1,6 µg ***vs*** 15,6 ± 2,6 µg/10^6 cellules ($p < 0,002$). Le CT se trouve ainsi statistiquement plus élevé dans les CML de P.o (X1,2).

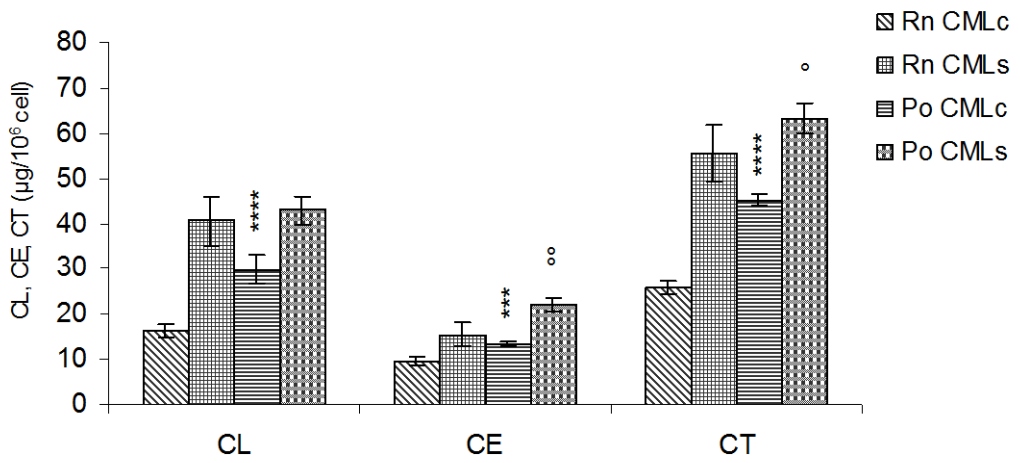


Figure 101 - Evaluation des fractions de cholestérol libre, total et estérifié dans les CML de R.n et P.o diabétiques en culture secondaire, aux phénotypes C et S.

CL, CT et CE estimés dans les CML de R.n et P.o diabétiques augmentent très sensiblement par rapport à l'état basal et à l'incubation de 48h. Cette activation du métabolisme du cholestérol est plus importante à l'état synthétique.
Les valeurs sont les moyennes de 7 déterminations affectées de l'écart type. Les différences entre états C et états S sont statistiquement significatives
(*) Etat C des CML de P.o ***vs*** état C des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o ***vs*** état S des CML de R.n

Par rapport à l'incubation de 4 P, le rapport CL/CE est peu modifié dans les CMLc des deux espèces mais il est significativement moins élevé qu'à l'état basal ($p < 0,0001$).
A l'état synthétique, le rapport CL/CE peu modifié dans les CML de R.n ($p < 0,05$) révèle une évolution comparable du CL et de CE. En revanche, il diminue significativement dans les CML de P.o ($p < 0,01$) indiquant une élévation du CE par rapport au CL.
Les différences établies entre les rapports respectifs des deux espèces sont statistiquement significatives aux deux phénotypes ($p < 0,01$).

IV. INFLUENCE DE L'INSULINE (FIG. 102, 103)

Sous l'influence de l'insuline pendant 48h, la fraction de CL diminue de façon significative dans toutes les conditions d'expérimentation. Toutefois elle reste plus élevée qu'à l'état basal ($p < 0,0001$). Cette diminution du CL est observée respectivement dans les CMLs de R.n et P.o incubées à long terme dans les rapport 1,5 et 1,4. Dans les CMLs de R.n et P.o diabétiques, le rapport de diminution est de 1,7.

Pour le CE, nous avons observé une diminution nettement significative puisque après action de l'insuline, pendant 48h, les valeurs sont comparables à l'état basal et les différences deviennent non significatives.

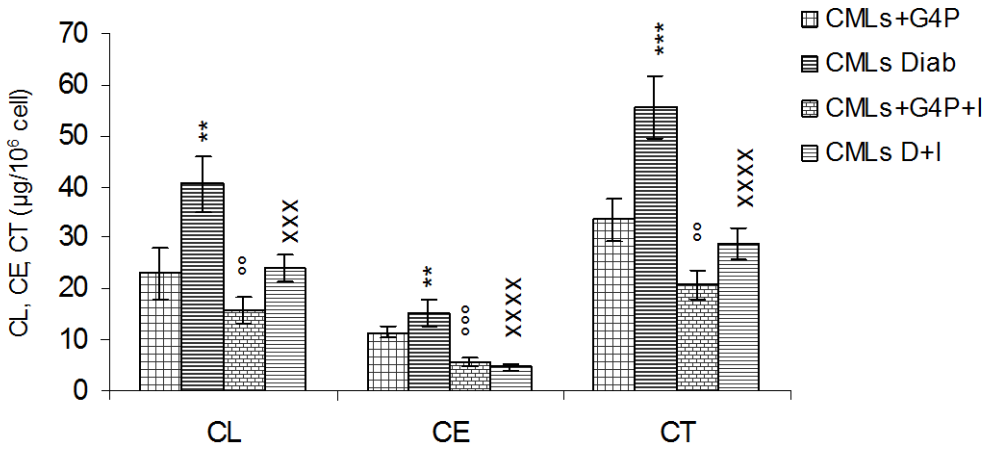


Figure 102 - Influence de l'insuline sur le cholestérol libre, estérifié et total contenus dans les CML de R.n en culture secondaire incubées dans un milieu enrichi en glucose (15 mM) durant 4P et dans les CML de R.n diabétique, au phénotype S.

Dans les deux conditions étudiées, l'insuline diminue statistiquement les 3 fractions de cholestérol. L'effet favorable de l'insuline s'observe en particulier sur le CE dont les valeurs sont proches de l'état basal.
Les valeurs sont les moyennes de 7 déterminations affectées de l'écart type.
(*) valeurs de Diab ***vs*** valeurs + G 4P
(°) valeurs + G 4P + Ins ***vs*** témoins correspondants
(x) valeurs de Diab + Ins ***vs*** témoins correspondants

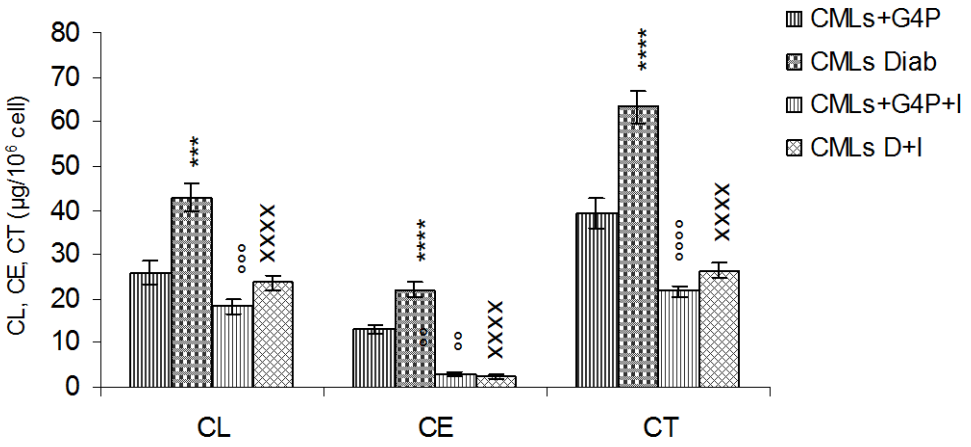


Figure 103 - Influence de l'insuline sur le cholestérol libre, estérifié et total contenus dans les CML de P.o en culture secondaire incubées dans un milieu enrichi en glucose (15 mM) durant 4P et dans les CML de P.o diabétique, au phénotype S.

Dans les deux conditions étudiées, l'influence de l'insuline est marquée par une diminution statistiquement très sensible des 3 fractions de cholestérol en particulier le CE dont les valeurs sont proches de l'état basal.
Les valeurs sont les moyennes de 7 déterminations affectées de l'écart type.
(*) valeurs de Diab ***vs*** valeurs + G 4P
(°) valeurs + G 4P + Ins ***vs*** témoins correspondants
(x) valeurs de Diab + Ins ***vs*** témoins correspondants

Les modifications de CL et de CE entraînent une élévation très significative du rapport CL/CE, notamment dans les CMLs de P.o (Fig. 105). En effet, il atteint 6,2 ± 1,1 dans les CMLs de P.o incubées dans le glucose à long terme contre 2,9 ± 0,9 dans les CMLs de R.n. Dans les CMLs de R.n et de P,o diabétiques, les rapport CL/CE sont respectivement équivalents à 5,2 ± 0,7 et 10,1 ± 1,7. Les différences interspécifiques sont très significatives ($p < 0,001$).

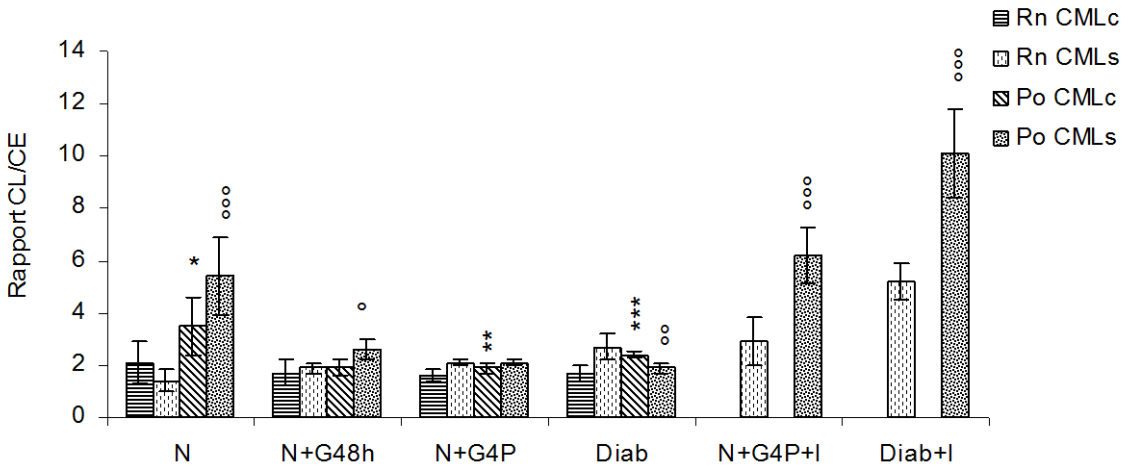


Figure 104 - Estimation du rapport CL/CE dans les différentes conditions expérimentales
Les valeurs sont les moyennes de 7 déterminations affectées de l'écart type. Les différences entre états C et états S sont statistiquement significatives notamment pour les CML de P.o.
(*) Etat C des CML de P.o ***vs*** état C des CML de R.n
(°) Etat S des CML de P.o ***vs*** état S des CML de R.n

V. CONCLUSION (Fig. 105, 106)

- L'activité cholestérogénique est plus importante à l'état synthétique qu'à l'état contractile dans les CML des deux espèces.
- A l'état contractile, CL et CE sont plus représentés dans les CML de P.o
- A l'état synthétique, le CL est plus important dans les CML de P.o mais le CE est plus représenté dans les CML de R.n.
- Le CL augmente significativement après une incubation au glucose de 48h. Le CE qui est peu modifié dans les CMLs de R.n augmente dans celles de P.o.
- Cette activité est accentuée au bout de 4P et très exagérée à l'état du diabète en particulier pour le CE dont le rapport d'augmentation est plus élevé comparativement au CL même si les valeurs de ce dernier restent plus élevées.
- L'influence de l'insuline se traduit par une diminution très significative des différentes fractions notamment celle du CE indiquant une augmentation spectaculaire du rapport CL/CE. L'effet favorable de l'insuline observé dans les différentes conditions d'expérimentation est plus marqué dans les CMLs de P.o.

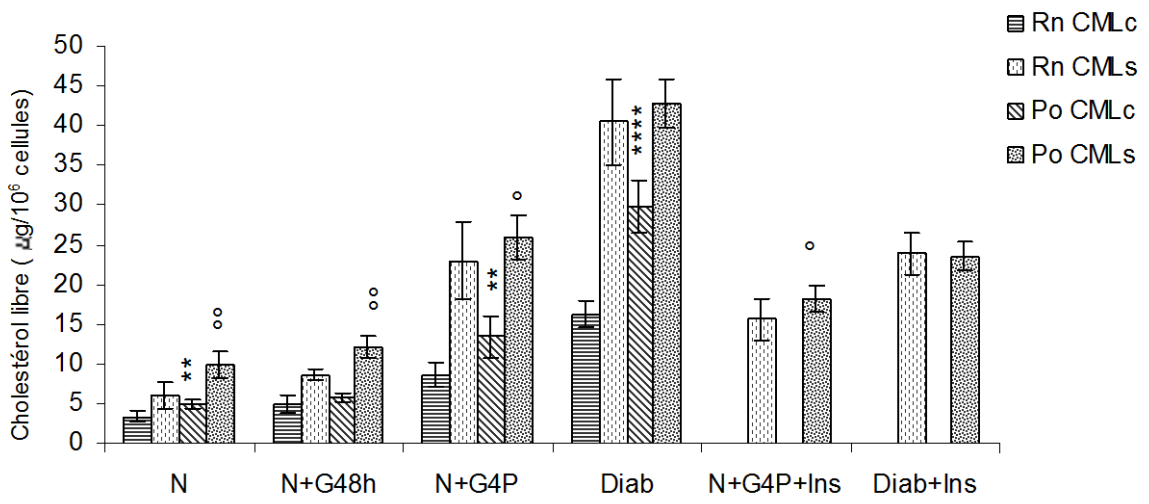


Figure 105 - Evolution du CL dans les CML de R.n et P.o en culture secondaire dans toutes les conditions expérimentales étudiées.

Les différences entre phénotypes C et phénotypes S sont statistiquement significatives pour les CML des deux espèces ($P < 0.01$ à 0.001).

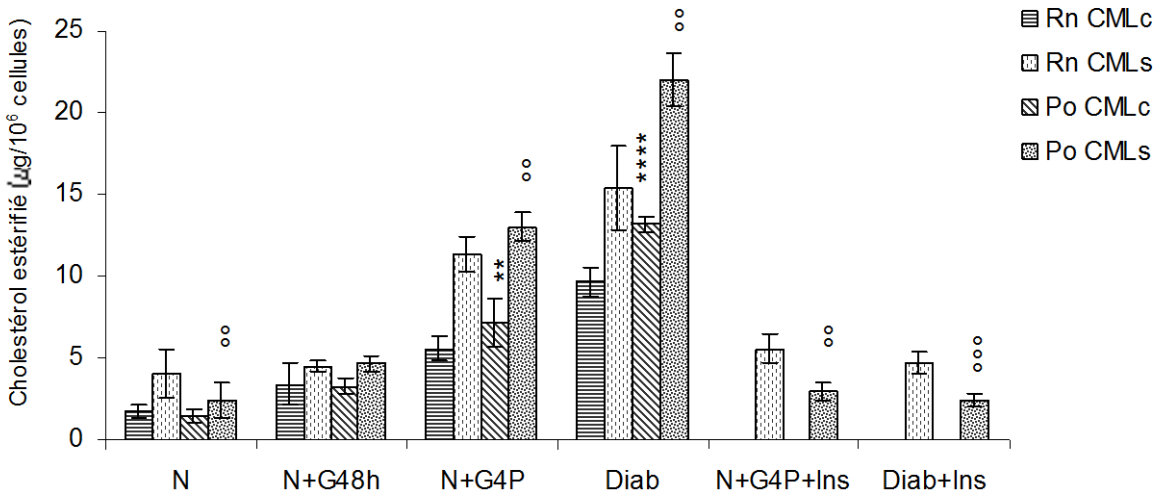


Figure 106 - Evolution du CE dans les CML aortiques de R.n et P.o en culture secondaire dans toutes les conditions expérimentales étudiées.

Les différences entre phénotypes C et phénotypes S sont statistiquement significatives pour les CML deux espèces après incubation au glucose à long terme et à l'état du diabète ($P < 0.01$ à 0.001). Elles sont peu significatives dans les autres conditions.

DISCUSSION

Cette étude nous a permis :

١. De mettre au point la technique de culture des myocytes aortiques provenant de P.o rendu diabétique non insulino-dépendant par un régime hypercalorique et de R.n rendu diabétique insulino dépendant par une injection de streptozotocine.

٢. D'évaluer quelques paramètres morphométriques, de déterminer l'activité cholestérogénique ainsi que la biosynthèse des protéines totales, des collagènes I et III et leur sécrétion au cours de la modulation des CML.

3. D'analyser les effets de concentrations élevées de glucose à court terme (48h) et long terme (4P) sur cette même activité cholestérogénique, la biosynthèse des protéines totales, des collagènes ainsi que leurs phénotypes (I et III) dans les CML aortiques de R.n et P.o en culture secondaire.

4. D'évaluer l'impact du diabète insulino-dépendant et non insulino-dépendant sur les CML et leur modulation et essayer d'établir leurs relations avec certains processus athéroscléreux en analysant l'activité cholestérogénique et la biosynthèse des collagènes .

5. De caractériser les sites antigéniques des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du collagène I et ceux des chaînes $\alpha 1$ du collagène III, vis à vis de leurs anticorps correspondants dans des conditions expérimentales choisies.

6. D'étudier l'influence de l'insuline à de faibles doses (4mU/ml) sur les CML synthétiques aortiques en culture secondaire incubées à long terme (4P) en présence de concentrations élevées de glucose et sur les CMLs de R.n et P.o diabétiques respectivement insulino dépendant et non insulino dépendant.

L'hyperglycémie caractérisant toutes les formes de diabète est considérée comme le facteur étiologique majeur dans le développement des complications vasculaires (West, 1982 ; Pinsard *et al.*, 1983 ; Lee *et al.*, 1989 ; Rudderman *et al.*, 1992).

De nombreuses hypothèses ont été avancées pour expliquer le mécanisme par lequel l'hyperglycémie altère le métabolisme et les fonctions des cellules vasculaires au cours du diabète (Mossaz et Assal, 1987 ; Lee *et al.*, 1989 ; Ahmed, 1991 ; Lesobre, 1994).

Le premier facteur pathogénique incriminé est la glycosylation non enzymatique ou glycation de différentes molécules (Brownlee *et al.*, 1984 ; Monnier *et al.*, 1984 ; Robert, 1985) dont celles de la matrice extracellulaire (les collagènes, la fibonectine...) et celles de la circulation (LDL...) (Ahmed *et al.*, 1986 ; Gupta *et al.*, 1992).

Comme précédemment décrite, la glycation est une réaction spontanée qui induit la formation d'AGEs ou Advanced Glycated End products (Lewis et Harding, 1990 ; Reiser, 1991 ; Guggliucci et Bendayem, 1995 ; Fujiwara et Nakaï, 1996) et ses conséquences biochimiques, physiologiques et pathologiques sont nombreuses et importantes. Elle induit notamment des perturbations fonctionnelles réversibles et des modifications structurales des protéines irréversibles telles le pontage. Les collagènes qui sont des protéines structurales majeures, subissent ces réactions de glycation lors du développement des lésions athéroscléreuses (Rosenberg *et al.*, 1979 ; Ahmed et Furth, 1990 ; Ahmed,1991) et du diabète (Kern *et al.*, 1979 ; Brownlee *et al.*, 1984 ; 1988). Ils montrent une rigidité croissante (Robert, 1985 ; 1993) dûe essentiellement à la diminution de l'activité de certaines métalloprotéinases ou enzymes protéolytiques de la MEC comme la collagénase qui augmente l'insolubilité des collagènes et empêche leur renouvellement (Kern *et al.*, 1986 ;

Robert, 1993). Les produits de glycation obtenus ou AGEs accélèrent l'évolution des plaques en se liant aux LDL (Brownlee *et al.*, 1985), favorisant la migration des CML (Higashi *et al.*, 1997), la surproduction de la MEC (Brownlee, 1992) en particulier l'accumulation des collagènes (Sakata *et al.*, 1995).

En revanche, l'augmentation de l'activité d'autres enzymes protéolytiques comme l'élastase semblent jouer un rôle important dans la déstabilisation des lésions en détruisant le tissu élastique (Bieth, 1978 ; Robert et Hornebeck, 1979 ; Robert *et al.*, 1984) sans modifier le taux de lipides (Arroyo et Lee, 1999 ; Davies, 1999).

Le second facteur impliqué est l'hyperactivité de la voie du sorbitol cellulaire (Spiro, 1976 ; Lee *et al.*, 1989). L'excès de glucose induit, sous l'influence de l'aldose réductase, une accumulation de sorbitol cellulaire (Gabbay *et al.*, 1975 ; Ahmed, 1991). Ce dernier est converti en fructose sous l'action de la sorbitol déshydrogénase, ce qui aggrave le déficit en myoinositol et aboutit à une diminution d'activité de la Na^+ K^+ ATPase avec comme conséquence une augmentation de la concentration intracellulaire de Na^+ (Fig. 108) (Winegrad, 1987). Il est établi que la voie du sorbitol est impliquée dans le développement de la cataracte diabétique (Ahmed, 1991). Par ailleurs, il semble qu'au cours du diabète une relation s'établit entre la voie du sorbitol et celle de la glycation (Fig. 107) (Ahmed, 1991) avec une augmentation de la formation d'AGEs (Mc Pherson *et al.*, 1988).

La modulation phénotypique des CML vasculaires aboutissant à un état synthétique sécrétoire (Campbell et Chamley Campbell, 1981 ; Ross, 1986 ; Campbell et Campbell, 1987 ; Thyberg *et al.*, 1990) , leur migration et prolifération de même que la sécrétion exagérée de la MEC (Ross, 1992) sont des éléments clefs de la restructuration du vaisseau athéromateux (Ross, 1986 ; Weissberg *et al.*, 1996).

Par ailleurs, par internalisation des LDL, les CML accumulent des esters de cholestérol (Campbell *et al.*, 1987 ; Bourdillon *et al.*, 1991) et se transforment progressivement en cellules spumeuses ou "foam cells". Les LDL en excès s'accumulent anormalement dans le sous-endothélium puis s'oxydent (Oram *et al.*, 1985 ; 1987b) et se comportent comme de véritables agents inflammatoires induisant la production de cytokines (Napoli *et al.*, 1997).

L'excès de synthèse des macromolécules de la MEC notamment les collagènes I et III (Robert, 1993), la transformation des CML en cellules spumeuses (Ross, 1986 ; 1992) et l'accumulation des lipides extracellulaires (Ross, 1986) sont donc des processus fondamentaux dans la physiopathologie artérielle (Bourdillon *et al.*, 1991). Cette dernière est plus précoce et plus sévère chez les diabétiques (West, 1978 ; Abbott *et al.*, 1988). Toutefois il ne semble pas exister de différences de fréquence de l'athérosclérose selon le type de diabète, qu'il soit insulino-dépendant ou non insulino-dépendant (Jacotot, 1993).

Nos expériences sont réalisées sur des CML en culture secondaire, à un passage précoce, en phase de prolifération, (état synthétique) et à post confluence (état contractile).

Afin de mimer un état d'hyperglycémie comparable à celui du diabète, nous avons dans un premier temps étudié les effets du glucose à forte dose (pendant 48h et durant 4 passages) sur l'activité cholestérogénique et la biosynthèse des collagènes de type I et III dans les CML aortiques en culture secondaire de R.n et notamment P.o. Nous avons focalisé notre étude sur le cholestérol et les collagènes de type I et III pour essayer d'établir l'interaction entre lipides et CML, collagènes et MEC ainsi que leur impact sur l'évolution de la pathologie athéroscléreuse chez nos modèles de diabète P.o NID et R.n ID. Ces phénomènes ont déjà établis pour différentes espèces (lapin, singe, rat de laboratoire, porc...) et sur différentes cellules (endothéliales, fibroblastiques, mésangiales, musculaires...) (Robert *et al.*, 1984 ; Kern *et al.*, 1986 ; Jimi *et al.*, 1995 ; Ang *et al.*, 1990).

Dans un deuxième temps, la même étude a été effectuée sur les CML de R.n diabétique insulinoprive et les CML de P.o diabétique non insulino-dépendant.

L'influence de l'insuline a été observée sur les CML synthétiques après leur incubation en présence de concentrations élevées de glucose à long terme et sur des CML de R.n et P.o diabétiques.

DONNEES MORPHOLOGIQUES ET MORPHOMETRIQUES.

Dans les cultures secondaires de CML aortiques de R.n et P.o, nous avons observé, en accord avec les travaux de Chamley Campbell *et al.* (1979), de Campbell et Campbell. (1987), de Godeau, (1990), de Thyberg *et al.* (1990), les deux états phénotypiques avec leurs caractères morphologiques distincts :

- les cellules synthétiques sécrétoires à aspect polygonal présentant un noyau arrondi central et un cytoplasme granuleux (Chamley Campbell *et al*, 1981 ; Ross, 1986 ; Bourdillon *et al*., 1989)
- les cellules contractiles, quiescentes, fusiformes présentant de nombreux prolongements cytoplasmiques et un noyau ovoïde suivant le grand axe cellulaire (Godeau, 1990).

Ross et Glomset, 1973 ; Bertha, 1986 ; Godeau, (1990) observent dans les CML synthétiques de nombreux organites (REG, ribosomes, appareil de Golgi, lysosomes) témoins de synthèses et dans les CML contractiles, un important réseau de myofilaments et de corps denses ou caveolae, invaginations de la membrane plasmique riches en canaux à calcium, responsables de la contractilité. Mahtout, (1981) retrouve dans les cellules médiatiques d'aortes de P.o normal de nombreux myofilaments.

"*In vivo*", selon Villashi *et al.* (1994), l'aorte normale présente deux types de CML : les MSMC (mediatic SMC ou CML de la média) qui ont le même aspect que celles observées à post confluence et les ISMC (intimal SMC ou CML intimales) qui présentent une importante vitesse de prolifération et produisent une riche MEC ; elles joueraient un rôle important dans le physiopathologie athéroscléreuse. Campbell *et al.* (1988) avaient déjà observé que les CML en culture présentaient les mêmes caractéristiques que les CML intimales. De même, Sartore *et al.* (1997) observent, après marquage de la myosine, dans les vaisseaux artériels adultes la coexistence de deux types de CML : une population dite "immature" caractérisée par la prolifération et la migration de la média vers l'intima et une population bien différenciée caractéristique de la média. A l'état du diabète NID et au stade ultime de la maladie (DID), les CML de la média de P.o se caractérisent par un REG dilaté et important et l'absence de myofilaments.

Les résultats obtenus par l'étude morphométrique montrent que les grands axes nucléaires et le nombre de nucléoles sont plus importants à l'état synthétique qu'à l'état contractile, en relation avec l'état fonctionnel de la cellule ; état selon Godeau (1990), caractérisé par l'abondance des organites impliqués dans les processus de synthèse.

Dans un milieu enrichi en glucose pendant 48h, l'observation des CML au microscope photonique inversé ne montre d'effets apparents que sur le nombre de nucléoles statistiquement plus élevé dans les CML synthétiques notamment. Ceci indiquerait une activation de la biogenèse des ribosomes impliqués dans la synthèse protéique. En revanche, l'approche biométrique révèle une augmentation significative de tous les paramètres étudiés (LC, LN, nombre de nucléoles). Les modifications biométriques relevées après l'incubation à long terme sont statistiquement plus importantes comparées à celle de 48h et à l'état basal.

Comparativement à l'état basal, l'état diabétique induit également une augmentation progressive de la taille des cellules synthétiques et contractiles mais par rapport à l'incubation au glucose à long terme, les CML de R.n et P.o diabétiques ne montrent pas de grandes variations.

Danne *et al.* (1993) observent des changements dans la forme des cellules mésangiales, endothéliales et rénales en culture incubées en présence de concentrations élevées de glucose. Benazzoug, (1998) relève également une modification de la taille des fibroblastes humains en présence de glucose pendant 24h. Des observations analogues sont relevées dans les cellules vieillies par Simons et Vanderbroeck, (1970) et Maciera-Coelho, (1973). Il apparaît donc que les concentrations élevées de glucose et le diabète induisent des variations observées lors du vieillissement. En effet, Goldstein *et al.*, (1969), Hamlin *et al.*, 1975 ; Bouissou *et al.* (1984, 1987) et Monnier *et al.*, (1984) précisent que sur le plan tissulaire, le diabète est assimilé à un véritable vieillissement précoce, par conséquent accéléré.

BIOSYNTHESE DES PROTEINES.

Dans cette étude, nous avons observé dans les CML contractiles une accumulation des protéines plus importante dans le CIC que le CEC ou équivalente. Les CML contractiles, quiescentes étant enrichies en protéines contractiles (myofilaments d'actine et de myosine) (Ross et Glomset, 1973 ; Chamley Campbell *et al.*, 1979 ; Godeau, 1990 ; Rolfe *et al.*, 1995 ; Van Leuven, 1996). Dans les CML synthétiques, l'incorporation de proline tritiée est en revanche plus élevée dans le CEC ; ceci serait en relation avec l'activité sécrétoire de la cellule qui produit les macromolécules de la MEC (Robert, 1985 ; Carey, 1991 ; Bendeck *et al.*, 1994 ; Robert, 1998). Ang *et al.* (1990) observent dans des CML aortiques de lapin à l'état synthétique, une synthèse protéique 5 à 6 fois plus élevée qu'à l'état contractile.

Une forte concentration de glucose (15 mM équivalents à 3g/l) dans le milieu d'incubation, s'accompagne dans les CML par une amplification des synthèses protéiques proportionnelle au temps d'incubation (48h, 4P). Après l'incubation de 4 passages, les CML synthétiques du R.n et P.o présentent, par rapport à l'état contractile basal, une augmentation de la synthèse protéique globale respectivement de 449 et 716%. Cette amplification concernerait diverses familles de protéines notamment celles qui constituent la MEC puisque la sécrétion protéique atteint 58,5% par les CML synthétiques de R.n et 65,9% par les CML synthétiques de P.o ainsi que les systèmes enzymatiques sollicités dans leur métabolisme.

Les résultats se rapportant à l'effet du glucose, rejoignent ceux de Macquart *et al.* (1980) et Kjellstrome, (1986) qui observent une importante augmentation du pool de proline tritiée intracellulaire. En 1992, Nahman *et al.* observent une légère augmentation de la biosynthèse des protéines totales de cellules mésangiales humaines incubées dans un milieu hyperglucosé. Pricci et al. (1992) observent après adjonction de glucose, une surproduction de la MEC par les CML vasculaires en culture. En revanche, Benazzoug. (1998) relève une synthèse protéique peu modifiée dans des fibroblastes cutanés humains incubés pendant 24h dans un milieu hyperglucosé, ceci probablement en relation avec le temps d'incubation relativement court.

La biosynthèse des protéines totales est encore plus exagérée dans les CML de R.n et P.o diabétiques. Elle augmente respectivement de 1039 et 1478%. L'incorporation de la proline tritiée est très élevée dans les deux compartiments (CIC et CEC) avec une légère

prédominance pour le CEC.

L'accumulation des protéines dans le compartiment extracellulaire indique une synthèse et une sécrètion importante de la MEC notamment à l'état synthétique. Il semble donc que, face à une incubation de glucose à long terme ou face au diabète, les CML réagissent comme les CML des lésions d'athéosclérose qui présentent une synthèse intense de la MEC (Nikkari *et al.*, 1994 ; Mac Leod *et al.*, 1994 ; Violaris *et al.*, 1996 ; Gordon et Rokhter, 1997 ; Nagler *et al.*, 1997).

Une accumulation notable des protéines est également observée dans les CIC et ce malgré l'importante sécrétion qui atteint respectivement 86,2% et 79,1% dans les CML synthétiques de P.o et R.n diabétiques. Cette importante concentration des protéines dans le CIC concernerait l'ensemble des systèmes enzymatiques sollicités et impliqués dans le métabolisme des macromoléculesde la MEC et/ou serait dûe à une vitesse de sécrétion insuffisante par rapport à la synthèse proprement dite.

L'activation des synthèses protéiques notamment dans les CML synthétiques de P.o et R.n diabétiques est le témoin d'un métabolisme intense de ces cellules qui, par ailleurs prolifèreraient plus (Ledet, 1975 ; Ledet *et al.*, 1976 ; Koschynsky *et al.*, 1981 ; Mac Leod *et al.*, 1994), augmenteraient la modulation de la MEC observée au cours du développement athéroscléreux (Robert et Robert, 1980 ; Robert et Greling, 1981 ; Lee *et al.*, 1995) et subiraient une importante migration "in vivo" (Nelson *et al.*, 1997). Cette activation des synthèses est également en relation avec les modifications morphométriques et morphologiques observées : augmentation de la taille des noyaux , des cellules et du nombre de nucléoles.

"In vitro", l'état diabétique est comparable pour les deux espèces animales avec toutefois une sensibilité plus marquée des CML de P.o , mettant encore une fois en exergue l'originalité du modèle diabétique que les travaux antérieurs du laboratoire ont mis en évidence dont ceux de l'hyperglycémie provoquée. Celle-ci effectuée sur des animaux nouvellement capturés a montré que 38% d'entre eux présentaient des tests de tolérance au glucose anormaux, ce qui suggère une prédisposition génétique au diabète.

Cette activité de synthèse et d'accumulation des protéines est également observée dans les CML à leur état contractile. A l'état basal, la synthèse globale des protéines est plus importante à l'état synthétique que contractile dans les rapports respectifs 2.1 et 3.4 pour les CML de P.o et R.n. A l'état diabétique, ces rapports diminuent et correspondent à 1.2 et 1.1. Il semble en effet qu'avec l'évolution de la maladie, les différences observées entre les deux phénotypes des CML à l'état basal soient plus atténuées au stade du diabète ; les CML auraient tendance à être représentées par un seul phénotype caractéristique des lésions athéroscléreuses (Campbell et al, 1988 ; Villaschi et al, 1994).

BIOSYNTHESE DES COLLAGENES.

De l'ensemble des protéines de la MEC, le collagène est un marqueur de choix car, d'une part c'est un constituant important de l'aorte (Jacotot, 1993) et d'autre part, il représente la molécule la plus fortement incriminée dans le processus athéroscléreux (Robert, 1985 ; Nagler *et al.*, 1997). La synthèse de collagène par les CML en culture a été démontrée d'abord par des études morphologiques et ultrastructurales (Daoud *et al.*, 1974 ; Boissel *et al.*, 1976) puis biochimiques par radiomarquage à la proline (Barnes *et al.*, 1976 ; Burke *et al.*, 1977, 1979 ; Ang *et al.*, 1990).

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la biosynthèse des collagènes totaux

ainsi que leurs phénotypes I et III par les CML aortiques de P.o normal, diabétique non insulino-dépendant comparativement aux CML de R.n normal et diabétique insulino-dépendant.

La même étude a été d'abord réalisée sur les CML exposées à une forte concentration de glucose à court et long terme.

Tenant compte des deux états phénotypiques, nos résultats ont indiqué que les CML synthétiques de R.n et de P.o élaborent et exportent plus de collagènes que les CML contractiles. Des résultats analogues sont obtenus par Ang *et al.* (1990) ; ils montrent qu'à l'état synthétique basal, les CML d'artère iliaque de lapin synthétisent 25 à 30 fois plus de collagènes que les CML contractiles. Majors et Erhart. (1992) observent dans les CML aortiques de lapin, une diminution de 70% de la biosynthèse des collagènes à post confluence par rapport à la phase prolifération synthétique.

L'influence de concentrations élevées de glucose, contribuant à la toxicité de l'hyperglycémie et aux complications vasculaires du diabète (Mc Clain *et al.*, 1992) induit, après les incubations de court et long terme, une augmentation de l'incorporation de proline tritiée dans le CEC des CML synthétiques de P.o en particulier, d'un facteur 6 après 48h et d'un facteur 16 après 4 passages par rapport à l'état contractile basal.

La synthèse des collagènes s'accentue aux états synthétiques des CML d'animaux diabétiques et correspond à des signes de désorganisation de la MEC. Ces résultats rejoignent ceux de Piétilä et Nikkari, (1980) qui relèvent une exagération de la synthèse des protéines et des collagènes en particulier dans les CML aortiques de lapin en culture. Selon Robert et Labat Robert, (1989), la MEC n'est plus synthétisée suivant son programme défini génétiquement. La néosynthèse des collagènes qui constituent le composant majeur de la MEC (Nagler *et al.*, 1997) marque l'aggravation de l'atteinte cellulaire suite aux effets des doses extraphysiologiques de glucose mais surtout lors d'un état diabétique. Elle serait en relation avec le développement du processus athéroscléreux caractérisé par la fibrose (Monnier *et al.*, 1986 ; Robert, 1993 ; Mc Leod *et al.*, 1994 ; Ferreira- Montero *et al.*, 1995) et l'épaississement intimal (Moose *et al.*, 1985). Karim *et al.* (1995) observent, après angioplastie vasculaire de l'artère iliaque de lapin, une activation transcriptionnelle des gènes de procollagène et notent que le collagène, constituant majeur d'une néointima proliférative, offre un aspect physiopathologique fibreux à la paroi (Katsuda *et al.*, 1992). Dans l'athérosclérose expérimentale induite par le cholestérol, Mc Cullagh et Ehrart, 1977, Nagornev et Mal'teseva, (1993) observent également une synthèse accrue de collagènes respectivement dans l'intima de l'aorte de rat et de pigeon. Mahtout, (1981) constate une accumulation importante de collagène dans les espaces intercellulaires d'aortes de P.o DNID et ID. Par ailleurs, outre son accumulation dans la média et dans l'intima, le collagène présente une insolubilité croissante au cours du diabète (Schneider et Kohn,1980 ; 1982 ; Sakata *et al.*, 1995 ; Sayeski et Kudlow, 1996 ; Sobolewsky *et al.*, 1997) dûe essentiellement à une diminution de l'activité des collagénases : métalloprotéinases de la MEC (Kern *et al.*, 1979 ; Robert, 1993 ; Tyagi et al .,1995). "*In vivo*", l'hyperlipidémie ou "*in vitro*" la présence de sérum hyperlipémique favorisent l'accumulation de collagènes insolubles (Moczar et Robert, 1976 ; Claire *et al.*, 1976).

"*In vivo*",Les CML d'aortes humaines saines produisent approximativement 30% de collagène de type I et 70% de collagène de type III (Mc Cullagh *et al.*, 1980 ; Light, 1982). Dans les conditions de culture, les CML expriment différemment le phénotype des deux types de collagènes. Burke *et al.* (1977 ; 1979) relèvent un même taux de collagènes I et III produits par des cultures de CML aortiques de singes très jeunes. De même, les CML primaires de cobaye produisent une proportion équivalente en collagènes I et III (Scott *et*

al., 1977). En revanche, les cultures de CML aortiques humaines adultes, de porc ou de lapin synthétisent plus de collagène I que de collagène III (Layman et Titus, 1975 ; Layman *et al.*, 1977).

Dans nos conditions d'expérimentation, l'étude qualitative et quantitative portant sur l'expression phénotypique des collagènes a montré que, les CML aortiques de R.n et P.o en culture secondaire précoce synthétisent plus de collagène I que de collagène III. En outre, l'intégration des chaînes α1 (I et III) et α2 (I) ainsi que l'estimation des taux de synthèse des collagènes I et III ont montré que les deux types de collagène sont plus importants :

- à l'état synthétique que contractile
- dans les compartiments extracellulaires que dans les cellules.

Ainsi, les CML modulables et transformables produisent plus de collagènes I et III à l'état synthétique qu'à l'état contractile. Selon Carey *et al.* (1991) ; Robert *et al.* (1993) ; Bendeck *et al.* (1994) et Lawrence *et al.* (1994), les CML synthétiques produisent essentiellement les collagènes de type I et III mais également les collagènes de type IV spécifiques des lames basales qui entourent les CML contractiles (Morton et Barnes, 1982 ; Katsuda *et al.*, 1992 ; Mc Guire *et al.*, 1992) ainsi que les collagènes de type V et XI (Lawrence *et al.*, 1994). Des résultats identiques sont enregistrés par Ang *et al.* (1990) ; ils indiquent une diminution de la biosynthèse des collagènes dans les CML post confluentes ainsi qu'une activation des ARNm codant pour les chaînes α1(I) et α1(III) des procollagènes dans les CML prolifératives synthétiques de lapin.

Notre étude portant sur les effets du glucose à court terme montrent quelques différences entre les CML de R.n et celles de P.o. Nos résultats indiquent que les concentrations élevées de glucose pendant 48h augmentent la proportion de collagène de type I et III dans les deux phénotypes. Cependant dans les CML contractiles et synthétiques de R.n ainsi que dans les CML contractiles de P.o, les proportions des collagènes de type I et III tendent sensiblement à l'équivalence ; le rapport collagène I/collagène III n'excède pas 1,3 alors que dans les CML synthétiques de P.o ce rapport est équivalent à 1,8 indiquant que le collagène I est plus synthétisé que le collagéne III.

L'augmentation du temps d'incubation des CML dans un milieu hyperglucosé durant 4 passages, montre une augmentation plus accentuée des collagènes de type I et III avec une prédominance du collagène I. Ce schéma s'aggrave dans les CML de R.n et P.o diabétiques. La masse principale des collagènes néosynthétisés au niveau des lésions d'athérosclérose tardives étant le collagène I (Mc Cullagh *et al.*, 1980 ; Labat Robert *et al.*, 1985 ; Robert, 1993), il semble que la CML synthétique de P.o, comparativement à celle de R.n, présente une sensibilité plus grande puisque dès 48h d'incubation, elle révèle quelques préludes du développement athéroscléreux avec une néosynthèse de collagène de type I plus importante que celle du collagène de type III. Dans les mêmes conditions d'expérience, les CML de R.n présentent des taux de collagènes I et III presque équivalents

Nos résultats rejoignent ceux de Karim *et al.* (1995) qui observent une augmentation de l'ARNm codant pour les chaînes α2 (I) et α1 (III) après 30 jours d'angioplastie expérimentale. Yan *et al.* (1995) démontrent par ailleurs, l'influence des collagènes I et III sur l'évolution de la plaque athéromateuse. Le collagène de type I localisé dans les lésions intimales, conjugué à celui du collagène de type III (Katsuda *et al.*, 1992), stimulerait la migration des CML synthétiques (Powel *et al.*, 1996). Selon Yamamoto *et al.*, 1993, le collagène I semble également promouvoir "*in vitro*" la modulation des CML aortiques de lapin. Par ailleurs, à l'inverse de Ross, (1986) qui relève l'effet inhibiteur des collagènes sur la prolifération, Reckter et Gordon (1994) observent que l'expression du collagène I et la

prolifération cellulaire sont deux phénomènes indépendants.

La répartition des différents types de collagène au niveau de l'aorte saine diffère de celle de l'aorte athéroscléreuse (Katsuda *et al.*, 1992 ; Robert, 1993 ; Lawrence *et al.*, 1994). Ceci se traduit par une hétérogénéité de l'expression des gènes de la MEC par les CML au cours du processus athéroscléreux. En effet certains gènes ne seraient exprimés qu'au niveau intimal, alors que d'autres le seraient au niveau intimal et médiatique (Ylä Hertuala, 1992 ; Nikkari *et al.*, 1994). Ainsi, la dérégulation du métabolisme des macromolécules de la MEC contribue au remodelage et à la restructuration vasculaire durant la pathogenèse de diverses maladies comme le diabète (Brownlee, 1992) et l'athérosclérose (Ang *et al.*, 1990 ; Ross, 1992 ; Roth *et al.*, 1996).

La synthèse anarchique de la MEC (Tyagi *et al.*, 1995) caractérisée essentiellement par la néosynthèse des collagènes de type I et III (Robert, 1985 ; Labat Robert *et al.*, 1991 ; Robert, 1993) provoque une réelle fibrose dans les lésions athéroscléreuses avec comme cause la glycation (Lyons, 1993). Gugliucci et Bendayan, (1995) montrent une accumulation précoce d'AGEs (Advanced glycation end products) dans les protéines plasmatiques et les histones des hépatocytes chez les rats rendus diabétiques par la streptozotocine. Stitt *et al.* (1997) notent par immunolocalisation, la présence d'AGEs et d' AGEr (receptor advanced glycated products ends) dans les vaisseaux rétiniens de rats streptozotocinés. La présence des produits de glycation dans les CML d'aorte semble jouer un rôle dans l'altération de la MEC (Brownlee, 1992) et dans la migration des CML (Higashi *et al.*, 1997). Ce processus s'aggrave et s'intensifie avec l'âge (Robert, 1983), l'athérosclérose et le diabète (Araki *et al.*, 1995 ; Deguine-Delay *et al.*, 1997).

La glycation des collagènes impliquerait un complexe réactionnel intermoléculaire induisant des changements de leurs propriétés physiques (Rosenberg *et al.*,1979 ; Bailey *et al.*, 1995), leur accumulation dans les plaques d'aortes âgées et l'inhibition de l'activité de la collagénase des CML (Sakata *et al.*, 1995). Au cours du diabète, la glycation précoce du collagène semble abolir l'effet inhibiteur du collagène sur la prolifération cellulaire favorisant ainsi la progression de la macroangiopathie (Ross, 1986 ; Sanders, 1994) laquelle est modulée par plusieurs facteurs dont l'HB-EGF (Heparin Binding Epidermal Growth Factor) produit par les CML (Taniguchi *et al.*, 1996). Une des principales voies par lesquelles interagissent les AGEs avec la paroi arterielle sont les récepteurs spécifiques RAGEs présents sur les surfaces des cellules endothéliales, des CML et des macrophages (Hori *et al.*, 1996 ; Schmidt *et al.*, 1996 ; Stitt *et al.*, 1997).

Dans nos conditions expérimentales, l'influence des concentrations élevées de glucose sur les CML de R.n et P.o et l'état du diabète induisent certainement la glycation des collagènes, impliqués dans les complications chroniques du diabète (Ino *et al.*, 1996). Toutefois, il a été extrêmement intéressant de constater que malgré toutes les altérations quantitatives qu'ont subi les collagènes, nos résultats se rapportant à la reconnaissance des sites antigéniques des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ des collagènes I et III par les anticorps correspondants indiquent que les déterminants antigéniques de ces molécules semblent conserver leur intégrité. En effet, après immunoblotting la reconnaissance des anticorps anti collagène I et anti collagène III se fait aussi bien dans les conditions d'incubation prolongée dans le glucose, dans les conditions de diabète insulino-dépendant ou non insulino-dépendant que dans les conditions standards.

CHOLESTEROL INTRACELLULAIRE.

Le cholestérol, molécule fortement incriminée dans la transformation cellulaire au cours de la pathogénie athéroscléreuse (Daly, 1971 ; St Clair et Lofland, 1971 ; Sukling et Stange, 1985 ; Bourdillon *et al.*, 1988 ; Hadjiisky *et al.*, 1991), est considéré comme un des précurseurs majeurs dans la formation des cellules spumeuses (Ross, 1986 ; Campbell et Campbell, 1987 ; Sanders, 1994). Le développement de l'athérosclérose est associé aux dépôts intra- et extracellulaires des esters de cholestérol (Smith, 1974 ; Goldstein *et al.*, 1974, 1975b). En effet au même titre que les macrophages, les CML accumulent les esters de cholestérol et contribuent à la formation des cellules spumeuses (Ross, 1986 ; Dussère *et al.*, 1992). La prolifération des CML et le processus de stockage du cholestérol sont donc des phénomènes majeurs dans le développement de la maladie athéroscléreuse (Ledet *et al.*, 1976 ; Chamley-Campbell et Campbell, 1981 ; Desgranges et Larrue, 1990 ; Corsini *et al.*, 1995 ; Sanders, 1994). Toutefois, la division et la croissance cellulaire restent des phénomènes indépendants de la cholestérogenèse (Tabacick *et al.*, 1985 ; 1991).

"*In vivo*", le mécanisme d'accumulation intra- et extracellulaire des lipides dans la paroi artérielle s'expliquerait par l'intervention des différentes voies de la régulation du cholestérol (Oram *et al.*, 1985) en particulier par les LDL plasmatiques (Ross et Glomset, 1973 ; Brown et Goldstein, 1975 ; 1984). Ces dernières, captées par les CML (Brown et Goldstein, 1986),sont internalisées par la voie des récepteurs (Brown *et al.*, 1975 ; Habenicht *et al.*, 1980 ; Munroe et Cotran, 1988) et par la voie indépendante de ces récepteurs lorsqu'elles sont oxydées (Jacotot, 1993 ; Dejager, 1998). Lewis et Taylor, (1994) notent une incorporation spécifique de LDL marquées au niveau des lésions d'athérosclérose. Elles s'accumulent aussi au niveau intimal, dans les macrophages et la MEC des lésions athéroscléreuses (Ross, 1986 ; 1992). Nagornev et Mal'teseva. (1993) observent une accumulation d'apo B liée aux LDL et une prolifération cellulaire dans l'intima d'aorte de lapin après induction expérimentale d'athérosclérose. Par ailleurs, Maggi *et al.* (1994) observent un taux élevé d'Anticorps anti LDL oxydées chez des patients atteints d'athérosclérose coronaire. "*In vitro*", selon le même auteur, l'oxydation des LDL par la cholestérol oxydase dans les CML en culture induit également une accumulation de lipides intracellulaires.

Les LDL anormalement accumulées et oxydées jouent donc un rôle critique dans le développement et la progression de l'athérosclérose (Liu *et al.*, 1991 ; Jacotot, 1992 ; Maggi *et al.*, 1994) car leurs multiples modifications (Ruddel *et al.*, 1986 ; Tertov *et al.*, 1992) sont la cause de l'accumulation intra- et extracellulaire des lipides (Oram *et al.*, 1985 ; Tertov *et al.*, 1992), de la prolifération des CML (Gorog, 1997) ainsi que de la production de collagènes (Jimi *et al.*, 1995).

Outre l'oxydation, les LDL subissent également la glycation qui transforme les propriétés physico-chimiques et métaboliques des apoproteines (Lopez et Virella *et al.*, 1988 ; Denishenko, 1990) et induirait une augmentation de la synthèse d'esters de cholestérol dans la macrophages. Les LDL glyquées seraient responsables des interrelations pathogéniques entre le diabète et l'athérosclérose (Ahmed, 1991). En revanche, les HDL, notamment celles interagissant avec l'Apo AI, possèdent un effet inhibiteur sur le développement des plaques d'athérosclérose (Martin *et al.*, 1987 ; Sche *et al.*, 1990, Duriez et Fuchart, 1994) causant l'efflux du cholestérol des CML et des macrophages (Martin *et al.*, 1987 ; Komaba *et al.*, 1992). Le rôle antiathérogène des HDL s'expliquerait donc par leur important efflux de la paroi artérielle (Stender et Hjelms, 1988).

Dans nos conditions expérimentales, le cholestérol libre, estérifié et total ont été déterminés sur les deux phénotypes des CML de R.n et de P.o en culture secondaire

lesquelles constituent "*in vitro*" un modèle de la modulation phénotypique précoce observée "*in vivo*" (Campbell et chamley - Campbell, 1981, Dussère *et al.*, 1992). Après estimation des fractions libres, totales et estérifiées du cholestérol, nous avons relevé deux fois plus de cholestérol dans les CML synthétiques comparativement aux CML contractiles. Ces résultats confirment ceux antérieurs de Tabacick *et al.* (1991), Dussère *et al.* (1992). Cette élevation de cholestérol libre serait due à une activation de la HMG Co A réductase qui joue un rôle clé dans la biogenèse du cholestérol libre à partir de l'acétate (Hadjiisky *et al.*, 1980 ; Campbell et al, 1987 ; Tabacick *et al.*, 1991). Nous avons également noté plus de cholestérol estérifié dans les mêmes cellules (x 2,5 dans les CMLs de R.n et x 1,6 dans les CMLs de P.o). Campbell *et al.* (1983) observent avec le changement de phénotype, une accumulation d'esters de cholestérol dans les CML synthétiques primaires de lapin associée à une légère diminution de l'activité spécifique de l'acide cholestéryl estérase (ACE).

Suite à une incorporation de β VLDL, Nishide *et al.* (1992) ainsi que Schreiber *et al.* (1992 observent une accumulation de cholestérol estérifié dans les CML en culture secondaire caractérisées par le phénotype synthétique. Mahley *et al.*, (1980) observent quelques années plus tôt le même phénomène dans les macrophages. Dans le phénotype synthétique, Skalli *et al.* (1986) présentent un système enzymatique différent de celui de l'aorte "*in vivo"* et des CML primaires avec notamment une augmentation de l'activité des enzymes lyposomiales dont l'estérase, observée "in vitro" sur les CML aortiques de rat par Bourdillon *et al.* (1989, 1991). En somme, il semble qu'au cours de la modulation phénotypique, avec l'augmentation de cholestérol intracellulaire, les CML en culture exhibent un changement enzymatique significatif : la diminution de l'activité enzymatique liée à la lipolyse cytoplasmique par la NCE et l'activation des enzymes lysosomiales (Bonner *et al.*, 1972 ; Leacke et Peters, 1982 ; Minors,1991).

Ces variations du système enzymatique à l'état synthétique seraient corrélées à l'augmentation de la biosynthèse des protéines totales observées dans les CML, au même état physiologique.

Sous l'effet du glucose à court terme (48h) et long terme (4P), l'activité cholestérogénique enregistrée est augmentée notamment à l'état synthétique. Quelques différences sont observées entre R.n et P.o après 48h d'incubation des CML synthétiques , le rapport CL/CE est peu modifié chez le premier alors qu'il diminue significativement chez le deuxième (60%).

Après une incubation de 4 passages, l'évolution des deux types de cellules est comparable avec toutefois des variations plus significatives pour P.o. Ceci indique que les CML de P.o exposées à des concentrations élevées de glucose se révèlent plus sensibles à stocker les fractions libres et estérifiées du cholestérol dès 48h d'incubation.

Dans les CML de P.o et R.n diabétiques, nous relevons une exagération de l'accumulation des fractions de cholestérol libre et estérifié en particulier, notamment aux états synthétiques.

"*In vitro*", l'excès de cholestérol libre qui s'accumule dans les CML (Chamley Campbell *et al.*, 1979 ; Campbell et Chamley-Campbell, 1981) conduit à une sur-régulation de la voie endogène de distribution et des voies endogènes et exogènes de rejet (Oram et al, 1985). Une des voies impliquées dans la biogenèse du cholestérol libre est la voie endogène de distribution par la HMG CoA dont l'activitation induit une accumulation de cholestérol (Campbell et Chamley -Campbell, 1981 ; Oram *et al.*,1983) et dont l'inhibition exerce un effet antiathérosclérotique direct sur la paroi artérielle (Corsini *et al.*, 1997 ; Bellosta *et al.*, 1998). Tabacick *et al.* (1985) ; (1987) observent, après inhibition de la HMG Co A réductase,

une régulation de la croissance cellulaire et de la biosynthèse du cholestérol dans les fibroblastes humains en culture. Certains inhibiteurs de la HMG CoA réductase induisent une diminution de l'épaississement intimal, par inhibition de la croissance cellulaire (Krause et Newton, 1991) ainsi qu'une diminution de synthèse du collagène de type I et de la fibronectine (Kitahara *et al.*, 1998).

Par ailleurs, les récepteurs HDL qui facilitent, "in vivo", le rejet de cholestérol libre (Goldstein, 1984 ; Komaba *et al.*, 1992) et qui possèdent un effet inhibiteur sur le développement de la plaque athéromateuse (Oram *et al.*, 1985) seraient déficients chez les diabétiques (Moulin *et al.*, 1987 ; She *et al.*, 1990), induisant ainsi par une autre voie que celle de la HMG CoA réductase l'accumulation de cholestérol libre.

Le cholestérol libre en excès se déposerait au niveau de la membrane plasmique des CML altérant ainsi la structure et l'organisation de la bicouche lipidique ; ce qui influerait sur la modulation phénotypique lors du processus athéroscléreux (Tulenko *et al.*, 1998).

Pour ce qui est du cholestérol estérifié, dans la paroi artérielle, il est régulé par plusieurs enzymes comme l'ACAT, la LCAT, l'acide cholestéryl estérase (ACE) et la neutral cholestérol estérase (NCE) (Ross et Glomset, 1973 ; Sukling et Stange , 1985). Il est établi que l'accumulation des esters de cholestérol est très importante dans les plaques athéroscléreuses (Campbell *et al.*, 1987 ; Sprinkle *et al.*, 1987). Dans les CML de R.n et P.o diabétiques, l'accumulation de la fraction estérifiée serait due à l'activation de l'ACAT : enzyme microsomiale qui catalyse l'estérification du cholestérol (Hashimoto *et al.*, 1973 ; Hashimoto et Dayton, 1974 ; Suckling et Stange, 1985 ; Krause et Newton, 1989).

Des études "*in vitro"* sur l'aorte de lapin (Proudlock et Day, 1972), de l'homme (Chobanian et Manzur, 1972) et du rat (Hashimoto et Dayton, 1974), ont relevé une faible activité basale de l'ACAT. Cependant, en présence de cette enzyme Brecker et Chobanian, (1974) notent une estérification du cholestérol radiomarqué incorporé. De même, de nombreux auteurs observent une stimulation de la synthèse d'esters de cholestérol dans les parois aortiques de lapin dès les premières phases du développement athéroscléreux (Kritchevsky et Khotari, 1973 ; Day et Proudlock, 1974 ; Kritchevsky et Khotari, 1978 ; Marquié, 1980b).

Selon St-clair *et al.* (1968, 1969) ; Hashimoto *et al.*, (1973) ; Morin *et al.*, 1974 ; Hashimoto et Dayton, (1978), le mécanisme majeur de l'estérification du cholestérol incombe à l'ACAT dont l'activité est multipliée par 50 dans l'aorte athéroscléreuse ; son inhibition préviendrait le processus athéroscléreux (Krause *et al.*,1989 ; 1992)

"In vivo", L'estérification du cholestérol ferait également intervenir l'ACE: enzyme lysosomiale, active à pH acide (Proudlock et Day, 1972 ; Proudlock *et al.*, 1973a ; 1973b ; Minors *et al.*, 1991) laquelle à l'inverse de l'ACAT augmente avec l'âge (Sprinkle *et al.*, 1987). Khotari *et al.* (1970), Peters *et al.*, 1972, Wolinsky *et al.*(1973), Takano *et al.* (1974) observent des lysosomes d'ACE dans les CML aortiques humaines et de lapin. Bourdillon *et al.* (1988, 1991) les retrouvent dans des CML aortiques de rat en culture secondaire ; ils sont également observés par Peters et de Duve, (1974), Minors *et al.* (1991) dans les plaques athéroscléreuses humaines.

L'autre enzyme qui pourrait également intervenir dans la régulation du cholestérol estérifié de la CML aortique est la NCE : enzyme cytosolique (Suckling et Stange, 1985), dont l'activité diminuerait pour permettre l'accumulation des esters de cholestérol. Sprinkle *et al.* (1987) observent cette diminution au cours du vieillissement.

L'augmentation de l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme des différentes fractions du cholestérol pourrait être liée à une stimulation de la transcription des gènes correspondants (Campbell et Campbell, 1981), cela en rapport avec l'augmentation du

nombre des nucléoles ainsi que la taille des noyaux et des cellules. La diminution des enzymes solubles comme la NCE serait en relation avec l'arrêt de leur transcription dans le cytosol.

En définitive, les CML contractiles mais essentiellement les CML synthétiques incubées à long terme dans un milieu hyperglucosé ainsi que les CML de R.n et P.o diabétiques accumulent du cholestérol libre et du cholestérol estérifié en particulier rappelant les préludes de la transformation spumeuse dans les plaques athéroscléreuses (Allan *et al.*, 1967 ; Ross, 1986 ; Sanders, 1994). Plusieurs mécanismes peuvent être incriminés au cours de la modulation phénotypique et du développement de certaines conditions expérimentales ou de pathologies comme le diabète. Ces mécanismes résulteraient d'un déséquilibre du mouvement cholestérol estérifié - cholestérol libre car ils dépendent de l'augmentation et/ou de la biosynthèse du cholestérol d'une part, de l'activation de l'estérification , de la déficience et/ou de l'élimination du cholestérol libre via les HDL d'autre part (Campbell et Campbell, 1987 ; Minors *et al.*, 1989 ; Bourdillon *et al.*, 1989 ; 1991).

EFFETS DE L'INSULINE.

L'insuline, principale hormone impliquée dans la régulation de la glycémie, assure ses actions métaboliques et mitogéniques en se liant à un récepteur de la membrane plasmique au niveau duquel elle initie ses effets (Cuatrecasas, 1972 ; Kahn *et al.*, 1993).

"*In vitro*", l'étude des effets de l'insuline sur la paroi vasculaire a été rendue possible par l'isolement et la mise en culture des cellules endothéliales et des CML (Vinters et Berliner, 1987).

Une des actions métaboliques majeures de l'insuline est de stimuler le transport du glucose dans différentes cellules dont les cellules endothéliales des gros vaisseaux et des capillaires (Vinters et Berliner, 1987) et les CML (Simpson *et al.*, 1990).

Le glucose est un substrat énergétique majeur des cellules de mammifères. Pour traverser les membranes, cette petite molécules hydrosoluble est prise en charge par des protéines spécialisées, les transporteurs d'hexoses qui appartiennent à deux familles non apparentées (Guerre-Millo, 1995) : les SGLT (sodium glucose transporters) qui assurent le transport actif (Hediger *et al.*, 1987 ; Turk *et al.*, 1994) dans les cellules intestinales (Burant *et al.*, 1994) et rénales (Kanaï *et al.*, 1994). La deuxième famille inclut les GLUT (glucose transporters) qui assurent la diffusion facilitée du glucose (Mueckler *et al.*, 1985 ; Saltis *et al.*, 1991 ; Lienhard *et al.*, 1992).

La plupart des cellules expriment une ou plusieurs isoformes de GLUT qui coopèrent dans le maintien de l'homéostasie glucidique de l'organisme (Guerre Millo, 1995). La structure secondaire de la première isoforme identifiée, GLUT 1, comporte 12 segments transmembranaires organisés en hélices (Hresko *et al.*, 1994) avec les fonctions N et C terminales intracytoplasmiques. GLUT 1 fonctionnerait comme canal hydrophile formé par 5 segments transmembranaires (hélices $\alpha 3, 5, 7, 8, 11$) riches en acides aminés à groupement hydroxyle et amine (Bell *et al.*, 1993). L'isolement des autres isoformes à partir de banques d'ADNc de divers organes (Pessin et Bell, 1992) a permis d'établir certaines analogies entre GLUT 1 et GLUT4 ; GLUT3 et GLUT6 ; GLUT2 et GLUT7 ; GLUT5 étant l'isoforme la plus divergente puisque transporteur de fructose (Bell et al., 1993). Le glucose traverse la membrane dans un sens ou dans l'autre suivant le gradient de concentration par la translocation réversible du transporteur transmembranaire (Cushman et Wardzala, 1980 ; Saltis *et al.*, 1991).

Les mRNA codant pour les GLUT1 et GLUT4 sont détectés dans l'endothélium des capillaires (Bilan *et al.*, 1992) mais aussi dans les CML aortiques (Mc Call *et al.*, 1997).

Dans les muscles et le tissu adipeux, l'expression de GLUT1 diminue à la naissance au profit de GLUT4, isoforme spécifique des tissus insulino sensibles (Santalucia *et al.*, 1992). En effet, GLUT4 est présent dans tous les tissus où le transport du glucose est sensible à l'insuline, la majorité des récepteurs étant localisée dans des vésicules intracellulaires (Cushman et Wardzala, 1980).

L'insuline par liaison à son récepteur membranaire engendre un signal qui déclenche rapidement un mouvement des vésicules de GLUT4 vers la membrane plasmique et leur intégration dans la bicouche permettant ainsi l'entrée de glucose massive. Les GLUT4 regagnent l'intérieur de la cellule probablement par la voie des puits recouverts (Slot *et al.*, 1991).

L'insuline possède diverses actions biologiques dont celles sur le métabolisme glucidique. Elle stimule la synthèse du glycogène dans le foie et dans le muscle suite à l'activation de la glycogène synthétase par déphosphorylation de l'enzyme (Van der Werve et Jeanrenaud, 1987 ; Dent *et al.*, 1990). Elle stimule également la glycolyse dans le foie, le tissu adipeux et le muscle par augmentation de la transcription de la pyruvate kinase (Vaulmont *et al.*, 1986), par stimulation de l'activité de la phosphofructokinase et de la pyruvate déshydrogénase par déphosphorylation (Denton, 1986). L'insuline inhibe l'influx du calcium dans les CML ainsi que leur contraction (Kahn *et al.*, 1997). Son effet inhibiteur sur la néoglycogénèse dans le foie à partir des lactates, des pyruvates, des acides aminés et du glycérol est dû à son action sur la transcription de la phosphoryl pyruvate carboxykinase (Hod *et al.*, 1986). L'insuline favorise le métabolisme du pyruvate pour la synthèse des acides gras (Robert et Taylor, 1972) et inhibe la lipolyse dans le tissu adipeux par son action sur les enzymes clefs au niveau transcriptionnel (Krahl *et al.*, 1972 ; Denton, 1986). Son effet mitogénique s'exerce par, activation de la synthèse protéique (Ira *et al.*, 1972 ; Wool *et al.*, 1972 ; Miller et Griffin, 1972) en favorisant la duplication du DNA (Rechler *et al.*, 1974 ; Vinters *et al.*, 1985), la transcription et le transport du mRNA ainsi que la translocation du tRNA sur le ribosome (Krahl *et al.*, 1972). Elle stimule par ailleurs la transcription de certains activateurs de transcription impliqués dans la différenciation et la prolifération cellulaire (Stout, 1975 ; O'Brien et Granner, 1991).

Le récepteur de l'insuline, exprimé dans tous les tissus de mammifères (Kahn *et al.*, 1981), fait partie des récepteurs à tyrosine kinase (Van der Geer *et al.*, 1994). C'est un hétérotétramère identique deux à deux (Kahn *et al.*, 1981, 1993). Chaque hétérodimère est constitué de deux sous unités α et β liées par des ponts dissulfures. La sous unité α , extracellulaire possède le site de liaison de l'insuline (Hédo et Simpson, 1984 ; Yip *et al.*, 1992). La sous unité β présente 3 domaines distincts : un petit domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire possédant l'activité tyrosine kinase (Zick, 1989). Dans le cas de l'insuline, la phosphorylation sur tyrosine du premier substrat intracellulaire (IRS1) représente une étape cruciale de la signalisation de l'hormone (Sun *et al.*, 1991). En effet, une fois phosphorylé, l'IRS1 interagit avec des protéines spécifiques activant d'une part la voie C (Sun *et al.*, 1991) qui semble intervenir dans la croissance cellulaire et dans le processus de translocation des transporteurs GLUT4 (Cheathamer *et al.*, 1994) et d'autre part la voie de la MAP kinase (Blenis *et al.*, 1993 ; Myers *et al.*, 1994) dont les actions sont variées : elle est transportée dans le noyau pour phosphoryler et activer certains facteurs de transcription, elle phosphoryle dans le cytoplasme le facteur 4E-BP1 qui contrôle l'initiation de la traduction et d'autres protéines impliquées dans le métabolisme du glycogène (Myers *et al.*, 1994). Sale *et al.* (1995) montrent que l'activation de la MAP kinase est nécessaire à l'activation de la kinase qui intervient dans le processus de différenciation ou de prolifération.

Dans nos conditions expérimentales, nous avons étudié l'effet de l'insuline à faible dose (4mU/ml) pendant 48h sur les CML synthétiques de R.n et de P.o exposées à de fortes concentrations de glucose durant 4 passages, sur les CML synthétiques de R.n et de P.o diabétiques.

* L'étude morphométrique montre que sous l'effet de l'insuline, les grands axes nucléaires et le nombre de nucléoles diminuent plus rapidement que les axes cellulaires.

* Concernant l'activité cholestérogénique, l'effet le plus favorable est observé sur le cholestérol estérifié qui indique une diminution de 89,2% dans les CML synthétiques de P.o diabétique contre 41,5% pour le cholestérol libre (tab).

* Par rapport aux témoins correspondants, nous avons noté une diminution de la synthèse des protéines, des collagènes totaux notamment celle du collagène de type I

* A dose faible (4mU/ml), il semble que l'insuline présente des effets antagonistes à ceux observés à des doses élevées, comparables à l'hyperinsulinémie (Stout, 1968, 1969, 1970, 1975 ; Vinters et Berliner, 1987 ; Shoemaker et Bonen, 1995).

Les taux de correction des protéines et des collagènes totaux obtenus sont comparables ; les résultats les plus significatifs sont observés sur les CML synthétiques de P.o diabétique qui présentent une diminution de la biosynthèse des protéines totales de 62,6% et celles des collagènes de 65,9% (tab). Kjellstrom et Malmquist. (1984) observent une augmentation des synthèses protéiques et du collagène dans les fibroblastes de sujets diabétiques insulino-dépendants et non insulino-dépendants exposés pendant 48h à des doses élevées d'insuline (102 à 105 mU/ml).

D'après Preuler *et al.* (1996), les CML artérielles de rat exposées à 10 mUI d'insuline /ml durant 14 jours subissent une croissance importante seulement au delà du 8ème jour.

En présence de doses élevées d'insuline, à court terme ou à long terme, le processus athéroscléreux s'installe et s'accélère rappelant ainsi l'hyperinsulinémie et les désordres métaboliques du diabète (Stout, 1979 ; Sowers, 1992 ; Chitry *et al.*, 1998). De plus, l'excès d'insuline augmente la synthèse d'ADN et la croissance des CML (Stout *et al.*, 1975 ; Shoemaker et Bonen, 1995) qui est considérée comme un facteur de la maladie vasculaire (Weissberg *et al.*, 1996).

L'influence de l'insuline à faible dose sur le phénotype des collagènes a montré une diminution significative de la biosynthèse des collagènes en général avec une diminution plus sensible du collagène de type I (de 53,5%) comparativement au collagène de type III (de 34,1%). Les taux de sécrétion des deux types de collagène diminuent également très significativement ; ce qui explique leur importante diminution dans le compartiment extracellulaire par rapport au compartiment intracellulaire qui modifie de façon peu significative son contenu en collagène I et III.

Enfin, la réaction la plus favorable de l'action de l'insuline sur l'activité cholestérogénique et la biosynthèse des collagènes I et III concerne les CML synthétiques de P.o diabétique (tab).

Nous avons également observé au cours de cette étude que les CML synthétiques exposées durant 48h à de faibles doses d'insuline, montrent une nette diminution de leurs activités mais ne retournent pas à l'état de contrôle.

Des études ultérieures réalisées à des temps d'incubation plus longs et/ou à d'autres concentrations, permettraient éventuellement une meilleure compréhension de l'effet de l'insuline sur les CML vasculaires au cours du diabète. L'insuline peut-elle ramener l'activité des CML aortiques à une certaine constance ou provoquerait-elle un phénomène de résistance observé par Schoemaker et Boner, 1995, Fujiwara et Nakaï, 1996.

En définitive, il ressort de cette étude que des doses faibles d'insuline induisent après 48h un réel effet thérapeutique sur les CML synthétiques en culture, exposées à des concentrations élevées de glucose et sur les CML synthétiques provenant d'animaux diabétiques.

Les effets favorables de l'insuline sont essentiellement marqués par :

- la diminution du cholestérol estérifié qui par accumulation donne des cellules spumeuses lors du procesus athéroscléreux (Ross, 1986, 1995)

- la diminution du collagène de type I (par rapport au collagène de type III) qui est franchement athérogène puisqu'il caractérise les plaques d'athérosclérose tardives et qui par accumulation induit la fibrose (Robert, 1993).

Enfin, les CML synthétiques de R.n diabétique insulino-dépendant et P.o diabétique non insulino-dépendant répondent à l'effet thérapeutique de l'insuline. Toutefois les CML synthétiques de P.o diabétiques présentent une plus grande sensibilité à l'hormone car les pourcentages de correction sont plus importants que dans la CML synthétique de R.n diabétique. Comparativement à R.n, P.o confirme une fois de plus sa remarquable sensibilité comme modèle du diabète expérimental.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION

Nous avons au cours de cette étude, analyser l'impact de concentrations élevées de glucose à court et long terme et des deux types de diabète, non insulino dépendant et insulino dépendant sur certains aspects morphologiques et physiologiques des CML aortiques en subculture telles :

- la modulation cellulaire,
- l'activité cholestérogénique intracellulaire,
- les variations de synthèse de quelques macromolécules de la MEC dont les collagènes de type I et III,
- les effets d'une approche thérapeutique hormonale par adjonction d'insuline à faible dose durant 48h au milieu d'incubation.

Pour cela, deux modèles cellulaires ont été décrits et utilisés :

- les CML provenant de P.o normal et rendu diabétique NID par un stress nutritionnel,
- les CML provenant de R.n normal et rendu diabétique ID par une injection de streptozotocine.

Il n'est pas superflu d'insister sur l'intérêt du choix de notre modèle expérimental, *Psammomys obesus*, qui est à notre connaissance un des rares modèles de diabète connu d'origine nutritionnelle. Les différents stades de l'évolution métabolique du diabète bien standardisés présentent des analogies avec ceux du diabète humain.

L'athérosclérose, maladie vasculaire responsable d'un taux de mortalité très élevé dans les pays développés et en nette progression dans les pays en voie de développement n'est pas une spécificité du diabète. En effet, ce dernier est caractérisé par des troubles de l'homéostasie du cholestérol cellulaire et des dérégulations qualitatives et quantitatives de la biosynthèse de certaines macromolécules de la MEC aortique notamment les collagènes et un processus athéroscléreux plus précoce et plus sévère.

Les progrès dans la compréhension des étapes majeures de l'athérosclérose ont été considérables néanmoins, de nombreux points restent à explorer dont la détection précoce de la maladie et le traitement adapté. Pour cela, notre étude "*in vitro*" sur les CML aortiques a été envisagée, en tenant compte de différentes conditions expérimentales en particulier la modulation phénotypique, l'excès de glucose dans le milieu d'incubation, l'état diabétique et l'influence de l'insuline.

La modulation cellulaire observée en subculture a montré des différences morphométriques entre les deux phénotypes, contractile et synthétique. Ce dernier présente un grand axe nucléaire et un nombre de nucléoles plus importants. Le grand axe cellulaire est plus petit dû à l'aspect polygonal de la cellule mais d'autres études morphométriques de superficie par exemple apporteront certainement d'autres détails sur la taille des cellules.

"*In vivo*", au cours du développement athéroscléreux, le passage spontané des CML aortiques d'un état contractile quiescent à un état synthétique prolifératif et sécrétoire est un des phénomènes majeurs du processus.

Sur le plan physiologique, la modulation cellulaire s'accompagne de modifications du métabolisme du cholestérol intracellulaire ainsi que des variations des éléments de la MEC (protéines totales, collagènes totaux, collagènes I et III) entre CIC et CEC. A l'état contractile, la synthèse globale des protéines est plus importante dans le CIC en corrélation avec sa fonction contractile essentiellement. A l'état synthétique, nous observons une accumulation plus importante dans le CEC expliquée par l'activité de la CML dans la synthèse et la sécrétion des macromolécules de la MEC. Les collagènes totaux en général et les phénotypes I et III en particulier sont plus représentés dans le CEC/CIC avec une prédominance du collagène I. "*In vivo*", les collagènes I et III s'expriment différemment dans la paroi artérielle saine avec une prédominance du collagène III. La CML aortique "*in vitro*" au phénotype synthétique rappelle morphologiquement et physiologiquement déjà la

cellule athérocytaire. Les variations de biosynthèse observées à l'état synthétique sont corrélées à l'augmentation de la taille des noyaux et aux nombre de nucléoles, marqueurs de l'ARNr.

En présence de concentrations élevées de glucose dans le milieu d'incubation à court terme et surtout à long terme, les CML, notamment à l'état synthétique, montrent une importante accumulation de CL et CE en particulier. Cette accumulation est exagérée aux états diabétiques ; signe d'un véritable dysfonctionnement de l'homéostasie du cholestérol intracellulaire. Ceci entraîne un déséquilibre entre voies de distribution et voies de rejet. Il faut toutefois noter que pour l'élaboration de cholestérol, la voie de distribution exogène par internalisation des LDL est prioritaire "in vivo" et la voie de distribution endogène de la HMG CoA réductase l'est "in vitro".

L'étude de la biosynthèse des protéines et des collagènes totaux montre que l'excès de glucose augmente l'accumulation des protéines totales et des collagènes néosynthétisés dans le CEC, elles est exagérée à l'état des diabètes NID et ID. Par ailleurs, malgré l'importance de la sécrétion dans le CEC, l'accumulation protéique et collagénique reste exacerbée dans le CIC, due probablement à une surexpression des gènes codants pour les macromolécules de la MEC causant une désorganisation certaine de leur biosynthèse.

Le glucose et encore plus le diabète, qu'il soit NID ou ID, semblent favoriser l'installation de perturbations métaboliques du cholestérol libre et estérifié ainsi que la synthèse anarchique des macromolécules de la MEC qui ne répond plus à son programme ; ceci en corrélation avec les modifications cellulaires nucléaires et nucléolaires relevées. En outre il semble qu'avec l'évolution du diabète et suite à l'excès de glucose, les différences observées entre CML contractiles et CML synthétiques à l'état basal sont moins marquées ; les cellules auraient tendance à être représentées par un seul phénotype, prolifératif et sécrétoire.

L'évolution des collagènes I et III est comparable à celle des protéines et des collagènes totaux. Ainsi, le glucose et le diabète augmentent de façon spectaculaire la synthèse des collagènes I et III et leur sécrétion dans le CEC. D'autre part, comme indiqués à l'état basal, les taux sont en faveur du collagène I, spécifique des plaques d'athérosclérose tardives. De nombreux travaux révèlent dans les plaques d'athérosclérose une proportion équivalente en collagène I et III. L'analyse de nos résultats a indiqué que sous l'effet du glucose à court terme, les CML de R.n présentent cette équivalence des deux phénotypes. En revanche, les CML de P.o exhibent dans les mêmes conditions expérimentales les proportions observées dans les plaques tardives. Ce qui met en exergue l'originalité de *Psammomys obesus* en tant que modèle de diabète expérimental par l'approche cellulaire.

L'intégration et l'analyse densitométrique des chaînes $\alpha 1$ (I + III) et des chaînes $\alpha 2$ (I) ont montré une augmentation des chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ et une diminution du rapport $\alpha 1/\alpha 2$ indiquant une synthèse plus importante des chaînes $\alpha 2$.

De plus, les modifications quantitatives de la MEC et du contenu cellulaire que nous avons relevé sont certainement accompagnées de modifications qualitatives telles la glycation, rapportée par de nombreux auteurs sur d'autres modèles cellulaires et chez l'homme. Néanmoins, l'analyse immunologique par immunoblotting nous a permis d'observer que les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du collagène I provenant de diabétiques ou celles incubées dans des concentrations élevées de glucose sont parfaitement reconnues, comparativement à l'état basal, par leurs anticorps correspondants, mettant en évidence l'intégrité de leurs sites antigéniques. Etant donné l'étroite similitude de la séquence aminée des chaînes α, l'analyse des chaînes $\alpha 1$ nous a révélé une réaction croisée par les anticorps correspondants qui ont également reconnu les chaînes $\alpha 2$.

Des doses faibles d'insuline de 5 à 10 unités, administrée pendant quelques semaines, ont induit chez certains animaux diabétiques insulinoprives une régulation sensible du niveau glycémique (Bouguerra, 1985 ; Bouderba, 1985 ; Khemici, 1985). Nous avons pour notre

part additionné l'insuline à une dose thérapeutique (4 mU/ml) durant 48h, dans des conditions expérimentales bien choisies qui sont l'état synthétique (rappelant la cellule athérocytaire), l'influence du glucose à long terme et l'état diabétique (où le métabolisme de la cellule est très perturbé). A cette dose, nos résultats ont indiqué que l'insuline présente des effets antagonistes à ceux observés par de nombreux auteurs ayant utilisé des doses élevées et dont les effets sont comparables à ceux de l'hyperinsulinémie qui induit une accélération du processus athéroscléreux. Il est apparu que l'effet de l'insuline a induit une amélioration spectaculaire des perturbations morphologique et physiologique des contenus intra- et extracellulaires des CML en étude. En effet, à dose thérapeutique, l'insuline diminue très sensiblement la taille des noyaux, plus que la taille des cellules, et le nombre de nucléoles ; L'activité cholestérogénique et de façon plus accentuée celle du CE, marqueur des cellules spumeuses ; la synthèse et l'accumulation des protéines et des collagènes I et III dans le CEC. En outre, cette diminution affecte plus sensiblement le collagène I marqueur des plaques d'athérosclérose tardives. Les taux de sécrétion subissent également une diminution très notable, ce qui explique qu'entre CEC et CIC, peu de différences sont observées dans les taux de collagène I et III.

Par ailleurs, si l'insuline diminue de façon très sensible les dérégulations observées dans les CML exposées à long terme à des concentrations élevées de glucose et dans les CML de diabétiques, elle ne permet pas le retour à l'état basal sauf pour le CE. Il semble donc que des doses faibles d'insuline parviennent à induire une régression très notables des modifications morphologiques et perturbations physiologiques des CML marquées par l'accumulation de CE/CL, par la synthèse exagérée de collagène I / collagène III. Toutefois, pour une meilleure approche de cet effet thérapeutique, des études complémentaires s'imposent :

- observer un temps d'incubation en présence d'insuline plus long, plusieurs jours voire plusieurs semaines et s'assurer que le retour à l'état basal et possible ou non,
- utiliser d'autres concentrations plus faibles pour tenter de contourner la résistance à l'insuline qui peut s'installer,
- analyser l'effet de l'insuline à un stade de diabète et de complications vasculaires précoces pour définir l'aspect préventif du traitement,
- analyser les récepteurs au glucose insulino sensibles, GLUT4 essentiellement,
- comparer l'effet de l'insuline aux différentes phases, réversibles et irréversibles de la glycation,
- Effectuer une étude sur la prolifération des CML en rapport avec la gravité du diabète et avec l'effet thérapeutique,
- envisager une étude cytogénétique pour une meilleure compréhension des dérégulations aux niveaux transcriptionnels et traductionnels des enzymes et récepteurs impliqués dans l'homéostasie du cholestérol, l'utilisation du glucose, la glycation ...

Selon Bonnet (2001), la prochaine étape du progrès sera le contrôle des mécanismes de la rupture de la plaque. Il est vrai que l'efficacité des inhibiteurs de la HMG CoA réductase, de l'utilisation des antioxydants nutritionnels (vitamine E, β carotène, acides gras monoinsaturés) ou pharmacologiques (statines) est partiellement liée au contrôle de certaines étapes cellulaires de la rupture. Néanmoins, il est évident que de nouvelles voies thérapeutiques essayant de contrôler la réaction inflammatoire, les enzymes de la MEC ou l'apoptose des CML se développeront et permettront de mieux contrôler la vulnérabilité des plaques athéroscléreuses.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

A

ABOTT RD ; DONAHUE RP ; KANNEL WB and WILSON PWF**.** (1988). The impact of diabetes on survival following myocardial infarction in men vs women. The framingham study. *JAMA*, **260**, 3456-3460.

ABSHER M and BALDOR L. (1991). Cinématographie Analysis of Vascular Smooth Muscle Cell Iinteractions With Extracellular Matrix. *In Vitro. Cell. Dev. Biol.*, **27A**, 25-30.

ACTON S ; RIGOTTI A ; LANDSCHULTZ KT ; XU S ; HOBBS HH and KRIEGER M. (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a HDL lipoprotein receptor. *Science.*, **271**, 518-520.

AHMED MU ; THORPE SR and BAYNES JW. (1986). Identification of carboxymethylysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J. Biol. Chem.*, **261** : 4889.

AHMED N. (1991). Glycation and Diabetic Complications. *J.P.M.A.,* **7***,* 171 – 174.

AHMED N. and FURTH AJ. (1990). Crosslinking, fragmentation and anomalous behaviour on SDS gels proteins glycated in vitro. *Biochem. Soc. Trans.*, **18**, 916.

ALAUPOVIC P. (1982). The role of apolipoprotein in lipid transport process. *Ric. Clin. Lab.*, **12**, 3-21.

ALLAN BY ; DAY MD ; PHIL D ; GWENDOLINE K and WILKINSON MSC. (1967). Incorporation of ^{14}C - Labeled acetate into lipid by isolated foam cells and by atherosclerotic arterial intima. *Circulation. Research.* , **XXI**, 593-598.

ALLEN DN ; SHROEDER WA and BALOG J. (1958). Observation of the chromatographic heterogeneity of normal adult and fœtal hemoglobin : study of the effect of cristallization and chromatography on the heterogeneity and isoleucine content. *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 1698-1734.

ALLEN S. (1998). Lipid / vascular wall interaction. *Curr. Opin. Cardiol.*, **13**, 439-446.

ANDREASSEN TT ; SEYER HANSEN K and OXLUND H. (1981). Biochemical changes in connective tissues induced by experimental diabetes*. Acta. endocr.*, **8**, 432-436.

ANDRESEN JL ; RASMUSSEN LM and LEDET T. (1996). Diabetic macroangiopathy and atherosclerosis. *Diabetes.*, **3**, S91-S94.

ANG AH ; TACHAS G ; CAMPBELL JH ; BATMAN JF and CAMPBELL GR. (1990). Collagen synthesis by cultured rabbit aortic smooth muscle cells. Alteration with phenotype. *Biochem. J.*, **265**, 461-469.

ANITSCHKOFF IN. (1913). Uber die veran derungen der Kaminichenaorta ber experimenteller choles-terinstriatose . *Betnz. Path. Annt. u.z.allg. path.*, **56**, 379.

ARAKI N ; HIGASHI T ; MORI T ; SHIBAYAMA R ; KAWABE Y ; KODAMA T ; TAKAHASHI K ; SHICHIRI M and HORIUCHI S. (1995). Glycation end products of the maillard reaction. *Eur. J. Biochem.*, **230**, 408-415.

AROYO LH and LEE RT. (1999). Mechanisms of plaque rupture : mechanical and biologic interactions. *Cardiovas. Res.*, **41**, 369-375.

B

BAILEY AJ. (1980). The nonenzymatic glycosylation of proteins. In : *Pathogenic concepts of diabetic microangiopathy. Hormone and metabolic research,* Eds stand and Men Nert., **11**, 90-94.

BAILEY AJ ; SIMS TJ ; AVERY NC and HALLIGAN EP. (1995). Non-enzymic glycation of fibrous collagen : reaction products of glucose and ribose. *Biochem. J.*, **305**, 385-390.

BALL RY ; STOWERS EL ; BURTON JH ; CARY NR ; SKEPPER JN and NIKHNSON AJ. (1995). Evidence that the death of macrophage foam cells contributes to the lipid core of atheroma. *Atherosclerosis.,* **114**, 45-54.

BARBARAS R. PUCHOIS P ; FRUCHART JC and AILHAUD G. (1990). Purification of an apoliprotein A binding protein from mouse adipose cells. *Biochem. J.*, **269**, 767-773.

BARNES MJ ; MORTN LF and LEVENE C. (1976). Synthesis of collagens type I and III by Pig medial smooth muscle cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 339-347.

BARNES MJ. (1985). Collagens in atherosclerosis. *Coll. Rel.* RS., **5**, 65-97.

BARONE LM ; FARIS B and CHIPMAN SD. (1985). Alteration of the extracellular matrix of smooth muscle cells by ascorbate treatment. *Biochem. Biophy. Acta.* , **840**, 245-254.

BARTENS W and WANNER C. (1994). Lipoprotein (a) : new insights into an atherogenic lipoprotein. *Clin. Investig.*, **72**, 558-567.

BASSUK JA and BERG RA. (1989). Protein disulphide isomerase, a multifunctional endoplasmic reticulum protein. *Matrix.*, **9**, 244-258.

BATEMAN JF ; LAMANDE SR and RAMSHAW AM. (1996). Collagen superfamilly. *Extracellular Matrix.*, **2**, 22-67.

BELARBI C. (1990). Effets de la thérapeutique aux sulfamides hypoglycémiants sur les troubles lipidiques et les complications vasculaires chez le rat des sables (P.o) rendu diabétique par un régime athérogène. Thèse Magister, USTHB, Alger.

BELIAN P. (1996). Génétique des dyslipidémies. Approche gène - candidat. Vol 1, Paris : Editions Inserm, 253.

BELL GL ; BURANT CF ; TAKEDA J and GOULD GW. (1993). Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J. Biol. Chem.*, **268**, 19161-19164.

BELLOSTA S ; BERNINI F ; FERRI n ; QUARATO P ; CANARESI M ; ARNABOLDI L ; FUMAGALL R ; PAOLETTI R and CORSINI A. (1998). Direct vascular effects of HMG CoA reductase inhibitors. *Atheroscl.*, **137**, S101-S109.

BENAZZOUG Y. (1981). Approche biologique d'un modèle expérimental pour l'étude du diabète : le rat des sables. Morphologie, histologie et ultrastructure du rein, du myocarde et de la peau. Mise en évidence de microangiopathies. Thèse 3ème cycle, USTHB, Alger.

BENAZZOUG Y ; BORCHIELLINI C ; LABAT-ROBERT J ; ROBERT L and KERN P. (1998). Effect of high-glucose concentrations on the expression of collagens and fibronectin by fibroblasts in culture. *Exp. Gerontol.*, **33**, 445-455.

BENDECK M.P ; ZEMPO N ; CLOWES A W ; GALARDY RE and REIDY MA. (1994). Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Circulation. Res.*, **75**, 539-545.

BENDITT EP. (1987). The origin of the atherosclerosis. *Sci. Am.*, **236**, 74-85.

BENDITT EP. (1988). Origins of human atherosclerotic plaques. The role of altered gene expression. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **112**, 997-1001.

BENLIAN P and LOUX N. (1991). Hétérogénéité des mutations du récepteur LDL dans l'hypercholestérolémie familiale. *Med. Sci*. **7**, 1052-1060.

BERG DJ ; KUHN R and RAJEWSKY K. (1995). Interleukin 10 is a central regulator of the response to Ips in murine models of endotoxic shock and the shwartzman reaction but not endotoxin tolerance. *J. Clin. Invest*., **96**, 2339-2347.

BERNSTEIN HD ; RAPOPORT TA and WALTER P. (1989). Cytosolyc protein translocation factors. Is SRP still unique ? *Cell.*, **58**, 1017-1019.

BERRY CL. (1987). Définition des lesions d'athérosclerose. In : *Maladies de la paroi arterielle*. Camillery. JP ; Berry CL ; Fiessinger JN ; Barriety MJ. Med. Sci. (eds) Flammarion.

BERTHA PH. (1986). Myocytes aortiques en culture primaire. Caractérisations biochimiques et pharmacologiques. *Thèse d'Etat, montpellier, C.R.B.M*.

BETTERIDGE DJ. (1989). Diabetes, Lipo Protein metabolism and atherosclerosis. *British. Med. Bull*., **45**, 285-311.

BIESBROECK R ; ORAM JF ; ALBERS JJ and BIERMAN EL. (1983). Specific affinity binding of high density lipoprotein in cultured human skin fibroblasts and arteral smooth muscle cells in culture. In : Campbell J and Campbell GH, 62-76.

BIETH J. (1978). Elastases : structure, functiun and pathological role. In : *Frontiers of matrix biology*. Robert L. (Eds) 6, Based Karger 1-82.

BILAN PJ ; MITSUMOTO Y ; RAMLAL T and KLIP A. (1992). Acute and long-term effects of insulin -like growth factor I on glucose transporters in muscle cells. translocation and biosynthesis. *Federation of European Biochemical Societies*., **298**, 285-290.

BLENIS J. (1993). Signal traduction via the MAP kinases : proceed at your own RSK. Proc. *Natl. Acad. Sci. USA*., **90**, 5889-5892.

BOISSEL JP ; BOURDILLON MC and CROUZET B. (1976). Histological arguments for collagen and elastin synthesis by primary cultures of rat aortic media cells. *Atherosclerosis*., **25**, 107-110.

BONNER MJ ; MILLER BF ; KOTARI HV. (1972). Lysosomal enzymes aorta of species susecptible and resistant to atherosclerosis. *Exp. Biol. Med*., **139**, 359-1362.

BONNET J. (2001). L'athérosclérose : un défi commun du biologiste et du clinicien. *Med. Sci*. ,**17**, 151-154.

BOS CR ; SHARK SL and SNIDER MD. (1995). Role of clathrin - coats vesicles in glycoprotein transport from the cell surface to the golgi complex. *J. Biol. Chem*., **92**, 6334-6338.

BOUDERBA S. (1985). Influence de deux régimes nutritionnels hypocaloriques sur l'évolution du syndrome diabétique chez le rat des sables *Psammomys obesus* et les complications vasculaires. Thèse Magister, USTHB, Alger.

BOUGUERRA S. (1985). Effets d'un biguanide, le N N diméthl biguanide sur l'évolution du syndrome diabétique chez le rat des sables *Psammomys obesus* et les complications vasculaires. Thèse Magister, USTHB, Alger.

BOUISSOU H ; JULIAN M and PIERRAGGI HT. (1984). Microangiopathie et atteinte conjonctive dermiques du sujet jeune avec ou sans antécédent direct cardiovasculaire ou diabetique. *Now. Presse. Med*., **13**, 2815-2816.

BOUISSOU H ; PIERAGGI Mth and JULIAN M. (1987). Variations morphologiques liées à l'âge. 60-66. In : *Maladie de la paroi arterielle*. Camillery. JP ; Berry CL ; Fiessinger JN ; Barriety MJ. Med. Sci. (eds) Flammarion.

BOURDILLON MC ; BLAES N ; TABIB A and CROUZET B. (1988). Etablissement d'une lignée transformée de CML artérielles. *CR. Série III*., 449-503.

BOURDILLON MC ; BOISSEL JP and CROUZET B. (1976a). Effect of hyperlipemic serum on the growth of primary cultures of rat aortic media . *Artery*., **2**, 384-450.

BOURDILLON MC ; BOISSEL JP ; CROUZET B and PERRIN A. (1976b). Primary culture of rat aortic media : a growth stophyhenomenon different from contact inhibition. *Biomedecine*., **25**, 263-267.

BOURDILLON MC ; BOISSEL JB and CROUZET B. (1976c). Xanthomatous cell formation in vitro from rat aortic media. *Arterial. Wall*., **3**, 101-104.

BOURDILLON MC ; BOISSEL JP and CROUZET B. (1977). Proliferation of primary culture from rat aortic media. Effects of hyperlipidemic serum. *Prog. Biochem. Pharmacol*., **13**, 103-110.

BOURDILLON MC ; DUSSERE E ; COVACHO C and BERTHEZENE F. (1991). Modulation des cellules musculaires artérielles en culture et mouvements de cholestérol. *Annales d'endocrinologie*., **52**, 468-466.

BOURDILLON M.C ; HADJIISKY P ; PEUCHMAURD M ; COVACHO C and GROSGOGEAT Y. (1989). Enzyme histochimical profil of proliferating arterial smooth muscle cells *in vitro* : Primary And Secondary Cultures. *Clin.Ter.Cardiovasc*., VIII, 3**, 293-296.**

BRADFORD M. (1976). A rapid sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilising the principe of protein dye binding. *Ann. Biochem*., **72**, 248-254.

BRECKER PI and CHOBANIAN AV. (1974). Cholesterol ester synthesis in normal and atherosclerotic aortas of rabitt and rhesus monkeys. *Circ. Res*., **35**, 692-701.

BRODSKY B and RAMSHAW AM. (1982). Characterization of fibrous form of collagen. *Methods in enzymology*., **82**, 127-174.

BROWN MS ; DANA SE and GOLDSTEIN JL. (1975). Recepteur -dependent hydrolysis of cholesteryl esters contained in plasma low density lipoprotein . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., **72**, 2925-2929.

BROWN MS and GOLDSTEIN JL. (1975). Familial hypercholesterolemia : genetic, biochemical and pathophysiologic consideration. *Adv. Intern. Med*., **20**, 273-276.

BROWN MS and GOLDSTEIN JL. (1976). The low lipoprotein pathway in human fibroblasts. Relation between cell surface receptor binding and enclocytosis of LDL. *Ann. N.Y. Acad. Sci*., **275**, 244-257.

BROWN MS and GOLDSTEIN JL. (1983). Lipoprotein receptors in the liver : control signal for plasma cholesterol traffic. *J. Clin. Invest*., **72**, 743.

BROWN MS and GOLDSTEIN JL. (1984). How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. *Sci. Am*., **215**, 58-66.

BROWN MS and GOLDSTEIN JL. (1985). Les récepteurs des LDL, le cholestérol et l'athérosclérose. *Pour la Science.,* **1**, 62-72.

BROWN MS and GOLDSTEIN JL. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*., **232**, 34-47.

BROWN MS and GOLDSTEIN JL. (1990a). Atherosclerosis. Scavenging for receptors (news). *Nature*., **343**, 508- 509.

BROWN MS and GOLDSTEIN Jl. (1990b). Lipoprotein receptors : Therapeutic implications. *J. Hypertens.,* **8**, 533-536.

BROWN MS and GOLDSTEIN JL. (1992). The genetic basis of hypercholesterolemia clinical and therapeutic implications. *Chung. Hua. T. H such. Tsa. Chih. Tapei*., **49**, 135-137.

BROWN MS ; KOVANEN PT and GOLDSTEIN JL. (1987). Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science*. , **212**, 528-535.

BROWN MS; LUSKEY K; BOHMFALK HK; HELGESON J and GOLDSTEIN JL. (1976). Rôle of the LDL receptor in the regulation of cholesterol and lipoprotein metabolisme. In : Greten H. ed. Lipoprotein metabolism Berlin, Springer., 82-89.

BROWN MS and GOLDSTEIN JL. (1997). LDL-receptor structor. Calcium cages, acid baths and recyling receptors (news ; comment). *Nature*., **388**, 629-630.

BROWNLEE M ; CERAMI A and VLASSARA H. (1988). Advanced glycosylation end-products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N. Engl. J. Med*., **318**, 1315-1321.

BROWNLEE M. (1992). Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care*., **15**, 1835-1843.

BROWNLEE M ; VLASSARA H and CERAMI A. (1984). Non enzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann. Int. Med*., **101**, 527-537.

BROWNLEE M ; VLASSARA H and CERAMI A. (1985). Non-enzymatic glycosylation products on collagen covalenty trap low density lipoprotein. *Diabetes*., **34**. 938.

BROWNLEE M ; VLASSARA H ; KOONEY A ; ULRICH P and CERAMI A. (1986). Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein crosslinking. *Science*., **232**, 629.

BRUCKERT E and CHAPMAN J. (1994). Low density lipoprotein receptor and hypercholesterolemia. *Rev. Prat*., **44**, 1287-1293.

BUCALA R ; MODEL P and CERAMI A. (1984). Modification of DNA by reducing sugars ; a possible mechanism for nucleic acid aging and age – related dysfunction in gene expression. *Proc. Natl. Acad. Scie. USA*., **81**, 105.

BURANT CF ; FLINK S ; DePAOLI AM ; CHEN J ; LEE WS ; HEDIGER MA ; BUSE JB and CHANG EB. (1994). Small intestine hexose transport in experimental diabetes. Increased transporter mRNA and protein expression in enterocytes. *J. Clin. Invest*., **93**, 578-85.

BURGESON RE. (1988). New collagens, new concepts. *Ann. Rev. Cell. Biol*., **4**, 551-577.

BURKE JM ; BALIAN G ; ROSS R ; and BONSTEIN P. (1977). Synthesis of types I and III procollagen and collagen by monkey aortic smooth muscle cells in vitro. *Biochemistry*., **16**, 3243-3249.

BURKE JM and ROSS R. (1979). Synthesis of connective tissue macromolecules by smooth muscle. *Connect. tissue Res*., **8**, 191.

C

CAMPBELL GR and CHAMLEY – CAMPBELL JH. (1981). Smooth muscle in atherosclerosis. *Pathology*., **13**, 424-439.

CAMPBELL JH ; POPADYNEC J ; NESTEL PY and CAMPBELL GR. (1983). Lipid accumulation in arterial smooth muscle cells. Influence of phenotype. *Atherosclerosis*., 47, **279-295.**

CAMPBELL GR and CAMPBELL JH. (1985). Recent advances in molecular pathology. SMC phenotypic changes in arterial wall homeostasis : implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Exp. Mol. Patho*l., **42**,139.

CAMPBELL JH and CAMPBELL GR. (1987). Cell biology of smooth muscle in culture : implication for the pathogenesis of atherosclerosis. *Exp. Mol. Pathol*., **42**, 139-162.

CAMPBELL JH ; CAMPBELL GR ; KOCHER O and GABBIANI G. (1987). Cell biology of smooth muscle in culture : Implications for atherogenesis. *Int. Angiol*., **6**, 73-79.

CAMPBELL GR ; CAMPBELL JH ; MANDERSON JA ; HORRIGAN S and RENNICK RE. (1988). Arterial smooth muscle. A multifunctional mesenchymal cell. *Arch. Pathol. Lab. Med*., **112**, 977-986.

CAREY D.J. (1991). Control of growth and differentation of vascular cells by extracellular matrix proteins. *Annu. Rev. Physiol*., **53**, 16111-16177.

CERAMI A ; VLASSARA H and BROWNLEE M. (1987). Glucose and aging. *Sci Amer*., **256**, 431-439.

CHAMLEY-CAMPBELL J ; CAMPBELL GR and ROSS R. (1979). The smooth muscle cell in culture. *Physiol. Rev*., **59**, 1- 61.

CHAMLEY-CAMPBELL JH ; CAMPBELL GR and ROSS R. (1981). Phenotype dependent response of cultured SMC to serum mitogens. *J. Cell. Biol*., **89**, 379.

CHAPMAN JA and HULMES DJS. (1984). Electron microscopy of the collagen fibril. In: *Ultrastructure of the connective tissue matrix*. Ruggeri A and Motta PM. 5 (eds) 317-350. *New York : Wiley-Liss, Inc*.

CHEATHAMER B ; VLAHOS CJ ; CHEATHAN L ; WANG L ; BLENIS J and KAHN CR. (1994) . Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of PP 70 S6 kinase , DNA synthesis and glucose transporter translocation*. Mol. Cell. Biol*., **14**, 4902-4911.

CHEUNG MC ; WOLF AC ; LUM KD ; TOLLEFSON JH and ALBERS JJ. (1986). Distribution and localization of lecithin Cholestrol acyltransferase and cholesteryl ester transferase aciticity in AI Containing lipoproteins. *J. Lipid. Res*., **27**, 1135-1144.

CHOBANIAN AV and MANZUR F. (1972). Metabolism of lipid in the human fatty streak lesion. *J. Lipid. Res*., **13**, 201-206.

CHU ML and PROCKOP DJ. (1993). Collagen : Gene, Structure In : *Connective Tissue and its Heritable Disorders. Molecular, Genetic and Medical aspects*. Royce PM and Steinmann B. (Eds) New York. 149-165.

CHYTRY V ; LETOURNEUR D ; BAUDYS M and JOZEFONVICZ J. (1998). Conjucates of insulin with copolymers of N -(2-hydroxypropyl) methacrylamide : effects on smooth muscle cell proliferation. *J. Biomed. Mater. Res*., **32**, 265-272.

CLAIRE M ; JACOTOT B and ROBERT L. (1976). Caracterization of lipid associated with macromodules of the intercullar matrix of human aorta. *Connect. Tissue. Res*. , **4**, 61-71.

CLARKE A ; STEWART PHILLIPS JL and SKAMENE E. (1987). Genetic control of susceptibility to atherosclerosis (with special emphasis on the role of the macrophage). *Clin. Invest. Med*., **10**, 499-512.

CLARKSON TB ; WEIGRAND KW ; KAPLAN JR and ADAMS MR. (1987). Mechanisms of atherogenesis. *Circulation.*, **76**, 20-28.

CLOWES A.W and SCHWARTZ S.M. (1985). Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotic artery. *Circulation. Res.*, **56**, 139-145.

CLYMAN RI ; MC DONALD KA and KRAMER RH. (1990a). Integrin receptors on aortic smooth muscle cells mediates adhesion to fibronectin, laminin, and collagen. *Circ. Res.*, **67**, 175-86.

CLYMAN RI ; TURNER DC and KRAMER RH. (1990b). An alpha 1/beta 1-Like integrin receptor on rat aortic smooth muscle cells mediates adhesion to laminin and collagen types I and IV. *Atherosclerosis.*, **10**, 402-409.

COMBETTES - SOUVERAIN M ; MILLAT F ; SEROUGNE C ; FEREZOU J and LUTTON C. (1999). SR-BI et métabolisme du cholestérol. *Med. Sci.*, **15**, 1252-1258.

CORREL CC and EDWARDS PA. (1994). Mevalonic acid depedent degradation of HMG CoA reductase *in vivo* and *in vitro*. *J. Biol. Chem.* , **269**, 633-638.

CORSINI A ; RAITERI M ; SOMA MR ; BERNINI F ; FUMAGALLI R and PAOLETTI R. (1995). Pathogenesis of atherosclerosis and the role of 3-hydroxy-3-methylglutoryl coenzyme A reductase inhibitors. *Ann. J. Cardiol.*, **76**, 21A-28A.

CORSINI A ; ARNABOLDI L ; QUAROTO P ; FERRI N : GRANATA R ; FUMAGALLI R and PAOLETTI R. (1997). Pharmacological control of biosynthesis pathway of mevalonate : effect of the proliferation of arterial smooth muscle cells. *C. R. Seances. Soc. Biol. Fil.*, **191**, 169-194.

CUATRECASAS P. (1972). The nature of insulin receptor interaction. In : *Insulin action*. Fritz IB. Acad. Press New York and London. 137-170.

CUSHMAN SW and WARDZALA LJ. (1980). Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cells. *J. Biol. Chem.*, 255, 4755-4762.

D

DAHMANI Y ; TABET M ; MARQUIE G ; ELSAIR J and DESBALS B. (1980). Etude de la lypolyse spontanée et stimulée d'adipocytes des rats de sables (*Psammomys obesus*) normaux obèses et diabétiques. *Ass. Nut*. Paris 22 – 23.

DAHMANI Y. (1981). Approche biologique d'un modèle expérimental pour l'étude du diabète : Psammomys obesus. Morphologie du pancréas endocrine et métabolisme de l'adipocyte après régimes hypo- et hypercalorique. Thèse de 3ème cycle, FSB/USTHB, 1981.

DALY MM. (1971). Biosynthesis of squalene and sterols by rat aorta. *J. Lipid. Res.*, **12**, 367-375.

DALY M and DALY S. (1973). On the ecology of *Psammomys obesus* (Rodentia gerbillidae) in the wadi saoura algeria. *Mammalia.*, **37**, 546-561.

DALY NL ; SCANLON MJ ; DJORDJEVIC JT. KROON PA and SMITH R. (1995). Three dimensional structure of a cystein-rich repeat from the low-density lipoprotein receptor. *Broc. Nath. Acad. Sci. USA.*, **92**, 6334-6338.

DANNE T ; SPIRO J and SPIRO RG. (1993). Effect of high glucose an type IV collagen production by cultured glomerular epithelial, endotthelial and mesangial cells. *Diabetes.*, **42**, 170-177.

DAOUD AS ; FRITZ K E ; JARMOLYCH J ; and AUJUSTYN JM. (1973). Use of aortic medial explants in the study of atherosclerosis. *Expl. Molec. Path.*, **18**, 177-189.

DAVIES MJ ; THOMAS AC. (1985). Plaque fissuring : the cause of acute myocardial, sudden ischeamic death and crescendo angina. *Br. Heart*., **53**, 363-373.

DAVIES MJ. (1999). Reactive oxygen species metalloproteinases and plaque stability. *Circulation*., **97**, 2382-2383.

DAVIS CG ; LEHRMAN MA ; RUSSELL DW ; ANDERSON RGW ; BROWN MS and GOLDSTEIN JL. (1986). The J.D. mutation in familial hypercholesterolemia : substitution of cysteime for tyrosine in cytoplasmic domain impedes internalization of LDL receptors. *Cell*., **45**, 15.

DAY AJ and PROUDLOCK JW. (1974). Changes in aortic activity. *Biochim. Biophys. Acta*., **326**, 428-438.

DAY S and MILLES EJ. (1978). Collagen in the physiology and pathology of connective tissue. (Eds. Fisher, New York).

DE LORGERIL M and SALEN P. (2000). Omega 3 - fatty acids, antioxydants and mediterranean diet : new nutitional strategies for the prevention and treatment of ischeamic heart disease. *S. T. V.*, **4**, 199-201.

DE WET W ; BERNARD M ; BENSON - CHANDA V ; CHU ML ; DICKSON L ; WEIL D and RAMIREZ F. (1987). Organization of the human pro α2 (I) collagen gene. *J. Biol. Chem*., **262**, 16032-16036.

DEGUINE-DELAY V ; MENASCHE M ; SCHEVERTEBEKE M ; SCHEVERTEBEKE J ; POULIGUEN Y and ROBERT L. (1997). Epigenic mechanisms of aging : relations between Maillard reactions and radical generation. *C.R.S. Soc. Biol. Fil*., **191**, 247-252.

DEJAGER S. (1998). Oxydation des LDL et antioxydants, de la théorie à la prescription ? *Metab. Horm. Nut*. , **II**, 19-24.

DENISENKO TV. (1990). Glycosylated lipoprotein as atherogenic factor in diabetes (review of the literature). *Vopr. Med. Khim*., **36**, 5 – 10.

DENT P ; LAVOINNE A ; NAKIELNG S ; CAUDWELL FB ; WATT P and COHEN P. (1990). The molecular mechanism by which insulin stimulates glycogen synthesis in mammalian skeletel muscle. *Nature.,* **348**, 302-308.

DENTON RM. (1986). Early events in insulin action. In : Advence in cyclic nucleotide and protein phosphorylation research. Vol 120, Greengard P ; Robinson GH. *(eds) Raven press Newyork,* 293.

DESGRANGES C and LARRUE J. (1990). Smooth muscle cell proliferation and atherosclerosis. *J. Nephrol*. , **1**, 35-44.

DION AS and MYERS JC. (1987). COOH terminal propeptides of the major human procollagen I. *J. Biol. Chem*., **261**, 8924-8935.

DOEGE KJ and FESSLER JH. (1986). Folding of carboxyl domain and assembly of procollagen. I. *J. Biol. Chem*., **261**, 8924-8935.

DOLFER R and WIELAND OH. (1979). Glycosylation of serum albumin in diabetic patients. *FEBS lettres*., **103**, 282-286.

DURIEZ P and FRUCHART JC. (1994). Determination of lipoproteins defined following their apoliprotein composition for the prediction of cardiovascular risk.. *Ann. Biol. Clin. Paris*., **52**, 179 - 83.

DURIEZ P and FRUCHART JC. (1997). Les dyslipoprotéinémies et le biologiste. *Med. Sci*., **13**, 1396-1398.

DUSSERE E ; BOURDILLON MC ; BLAES N ; COVACHO C and CIAVATTI M. (1990). Synthèse et flux de cholestérol du myocyte artériel modulé *in vitro*. 4ème Créteil Symposium on Lipids, Lipoproteins and Nutrition., 378-379.

DUSSERE E ; BOURDILLON MC ; BLAES N and COVACHO C. (1992). Mouvements de cholestérol dans les cultures de cellules musculaires lisses artérielles. Réunion commune : Société Française d'Athérosclérose - Société Française du Tissu Conjonctif.

DUVERGER N ; GHALIM N ; THERET N ; DUCHATEAU P ; AGUIE G ; GASTRO G and FRUCHART JC. (1990). Lipoprotein AI Containing particles. In : *Hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia, hypocholesterolemia and in vivo kinetics*. Mahmendier CL ; Breuer HB ; Alaupovic PH. Eds. New York : Phenum Press. 85-92

E

EATON D ; FLESS D and KOHR W. (1987). Partial amino acid sequence of apolipoprotein (a) shows that is homologous to plasminogen. *Proc. Natt. Acad. Sci. USA.*, **84**, 3224-3228.

EDWARD D and HARRIS D. (1997). Lipoprotein (a) : A prodictor of atherosclerotic disease. *Nutrition. Reviews.*, **55**, 61-64.

EL LEMDANI CHERCHALI F. (1993). En communication.

ESSER V ; LIMBIRD LE ; BROWN MS ; GOLDSTEIN JL and RUSSEL DW. (1988). In "*The low density lipoprotein receptor"*. SCHNIDER WJ. Biophysica. Acta., **988**, p. 309.

EVANS EA ; GILMORE R and BLOBEL G. (1986). Purification of microsomal signal peptidase as a complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **83**, 581-585.

EYRE DR and GULLOP PM. (1984). Cross-linking in collagen and elastin. *Ann. Rev. Biochem.*, **53**, 717-748.

F

FALK E ; SHAH PK and FUSTER V. (1995). From bench to beside coronary plaque disruption. *Circulation.*, **92**, 657-671.

FARIS B ; TAN OT ; TOSELLIO P and FRANZBLEAU C. (1992). Long-term neonatal rat aortic smooth muscle cell cultures : a model for the tunica media of a blood vessel. *Matrix.*, **12**, 185-188.

FAURY G. (1998). Role of the elastin - laminin receptor in the cardiovascular system. *Path. Biol,*. **46**, 517-526.

FERREIRA - MONTERO IJ ; FERREIRA-QUAR AI and CASASNOVAS - LENGUAS JA. (1995). The pathogenesis of the evolution of the atheroma plaque. *Rev. Esp. Cardiol.*, **48**, 13-22.

FLOWER S ; SHIO H and WOLINSKY H. (1977). Subcellular fractionation and morphology of aortic smooth muscle cells. Studies on Whole aorta explants and subcultures grown under different conditions. *J. cell. Biol.*, **75,** 166-184.

FOIDART JM ; BERE EW and YAAR M. (1980). Distribution and electron microscopic localization of laminin, a non collagenous basement membrane glycoprotein. *Lab. Ivest.*, **42**, 336-342.

FOLCH. J ; LEES M and STANLY GHS. (1957). A simple method for the isolation on purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.

FRANK SL ; KLISAK I and SPARKS RS. (1988). The apoprotein (a) gene resides on human chromosome 6q 26-27 in close proximity to the homologous gene for plasminogen. *Hum. Gent.* , **79**, 352-356.

FREDERICKSON DS ; LEVRY RI and LEES RJ. (1967). Fat transport in lipoprotein : an integrated approach to mechanisms and discorder. *N. Engl. J. Med.*, **276**, 215 - 273.

FREDRICKSON DS and LEVRY RI. (1972). Familial hypercholesterolemia. In : *The metabolic basis of inherited disease*. Stanbury JB ; Wyngaarden JB ; Fredrickson DS. (eds) MC Grow-hill, Newyork. 545 -611.

FREY J and RABY N. (1991). Lysine et collagènes. *Ann. Biol. Clin.*, **49**, 36-39.

FRONLICH JJ ; DESCOMBE DW and PRITCHARD PH. (1989). The role of apoproteins in disorders of lipoprotein metabolism. *Clin. Bioch.* , **22**, 51-56.

FRUCHART JC. (1992). Le transport du cholestérol et sa fixation dans les artères. *P. la Sci.*, **175**, 40-47.

FRUCHART JC. (1993). Lipides, Lipoproteines et athérosclérose. In : *Athérosclérose.* Jacotot B., Eds Sandoz.

FU MA ; KNECHT K ; THORPE S and BAYNES J. (1992). Role of oxygen in cross - linking and chemical modification of collagen by glucose. *Diabetes.*, **41**, 42-52.

FUJIWARA R and NAKAÏ T. (1996). Effects of glucose, insulin and insulin-like growth factor I on glucose transport activity in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis.*, **127**, 49-57.

FÜLOP JR ; JACOB MP ; KHALIL A ; WALLACH J and ROBERT L. (1998). Biological effects elastin peptides. *Pathol. Biol.*, **46**, 497-506.

FURTHMEYER H ; WIEDERMAN H and TIMPL R. (1983). Electron microscopical approach to a structural model of intima collagen. *Biochem. J.*, **211**, 303-311.

FUSTER V ; BADIMON L ; BADIMON J ; TAUBMAN MB and CHESEBRO JH. (1990). Syndromes of accelerated atherosclerosis : role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **15**, 1667-1687.

FUSTER V ; BADIMON LB; BADIMON JJ and CHESEBRO JH. (1992). The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N. Engl. Med.*, **324**, 310-318.

G

GABBAY KH. (1975). Hyperglycemia, polyol metabolism and the complications of diabetes mellitus. *Ann. Rev. Med.*, **17**, 239-243.

GAVEY KL ; TRUJILLO DL and SCALLEN TJ. (1983). Evidence for phosphorylation / dephosphorylation of rat liver acyl COA : Cholesterol acyltransferase.. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.*, **80**, 2171-2174.

GEY KF and FUSKA P. (1989). Plasma, vitamin E and A inversaly correlated to mortality from ischemic heart disease in cross - cultured epidemiology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **570**, 268-282.

GIL G ; FAUST JR ; GOLDSTEIN JL and BROWN MS. (1985). Membrane bound domain of HMG CoA reductase is required for sterol enhanced degradation of the enzyme. *Cell.*, **41**, 249.

GODEAU G. (1990). La cellule musculaire lisse. *Revue de la veine et du lymphatique.*, **4**, 8-11.

GOLDSTEIN JL. (1984). Biologie cellulaire et moléculaire du diabète. *Pathol. Biol.* (Paris)., **32**, 99-106.

GOLDSTEIN JL and BROWN MS. (1975a). Lipoprotein receptors, cholesterol metabolism and atherosclerosis. *Acta. Pathol.*, **99**, 181-184.

GOLDSTEIN JL and BROWN MS. (1977). The low density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Ann. Rew. Biochem.*, **46**, 897 - 930.

GOLDSTEIN JL and BROWN MS. (1983). Familial hypercholesterolemia : In *The metabolic basic of inherited disease.* Stanbury JB, Wyngaarden JB, fredrickson DS, Goldstein JL, Brown MS editors ed 5. Mc Graw-Hill Book Co, Inc, 672.

GOLDSTEIN JL and BROWN MS. (1984). Progress in understanding the LDL receptor and HMG CoA reductase. Two membranes that regulate plasma cholesterol. *J. Lipid. Res.*, **25**, 1450-1984.

GOLDSTEIN JL and BROWN MS. (1987). Regulation of Low-density lipoprotein receptors : implications for pathogenesis and therapy of hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circulation.*, **76**, 504-507.

GOLDSTEIN JL ; BROWN MS ; ANDERSON RGW ; RUSSEL DW and SCHNEIDER WJ. (1985). Receptor-mediated endocytosis : concepts emerging from the LDL receptor system. *Ann. Rev. Cell. Biol.*, **1**, 1.

GOLDSTEIN JL ; DANA SE and BROWN MS. (1975b). Genetic heterogeneity in familial hypercholesterolemia : evidence for two different mutation : evidence for two different mutation affecting functions of LDLR. *Proc. Natl. Acad. Scie. USA.*, **72**, 1092-1096.

GOLDSTEIN JL ; DANA SE ; FAUST JR ; BEAUDET AL and BROWN MS. (1975c). Rôle of lysosomal acid lipase in the metabolism of plasma low lipoprotein . Observations in cultured fibroblasts from a patient with cholesteryl ester storage disease . *J. Biol . Chem.*, **250**, 8487-8495.

GOLDSTEIN JL ; DANA SE and BROWN MS. (1974). Esterification of low density lipoprotein cholesterol in human fibroblasts and its absence in homozygous familial hypercholesterolemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 4288-4292.

GOLDSTEIN S. (1984). Cellular and molecular biological studies on diabetes mellitus. *Path. Bi*ol., **32**, 99-106.

GOLDSTEIN S ; HARLEY CB and BROWN MS. (1979). In vitro studies of age associated diseases. *Fed. Proc.*, **38**, 1862-1867.

GOLDSTEIN S ; LITTLEFIELD JW and SOELDNER JS. (1969). Diabetes mellitus and aging : Diminished plating efficiency of cultured human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Scie. USA.*, **64**, 155-160.

GORDON D and REKHTER MD. (1997). The growth of human atherosclerosis : Cell proliferation and collagen synthesis. *Cardiovasc. Pathol.*, **6**, 103-116.

GORDON T ; CASTELLI WP ; HJORTLAND MC. KANNEL WB and DAWBERT R ; (1977b). HDL as a prospective factor against coronary heart disease. *Am. J. Med.* , **62**, 707-714.

GORDON T ; CASTELLI WP HJORTLAND MD and KANNEL WB. (1977a). The prediction of coronary heart disease by high density and other lipoproteins : an historical perspective. *Hyperlipid. Diag. and Therapy.*, **16**, 71-78.

GOROG P. (1997). Modified low density lipoprotein is a potent stimulus for smooth muscle cell out growth from rat aortic explant in vitro. *Atheroscl.*, **129**, 1-7.

GOTTO AM and PAOLETTI R. (1986). Atherosclerosis review. New York. Raven Press. **14**, 143-217.

GOTWALS PJ ; CHI ROSSO G ; LUIDNER V ; YANG J ; LING L ; FAWEL SE and KOTELIANSKY VE. (1996). The alpha1 beta1 integrin is expressed during neointima formation in rat arteries and mediates collagens matrix reorganization. *J. Clin. Invest.*, **97**, 2469 - 2477.

GRABAR P and WILLIAMS CA. (1953). Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. *Biochim. Biophys. Acta.*, **10**, 193-194.

GRUNDY SM and DENKE MA. (1990). Dietary influences on serum lipids and lipoproyeins. *J. Lipid. Res.*, **31**, 1149-1172.

GUERRE MILLO M. (1995). Les transporteurs d'hexoses. *Med. Sci.,* 11, 1111-1119.

GUGLIUCCI A and BENDAYAN M. (1995). Histones from diabetic rats contain increased levels of advanced glycation end products. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **212**, 56-62.

GUPTA S ; RIFICI V ; CROWLEY S ; BROWNLEE M ; SHUN Z and SCHLONDORFF D. (1992). Interactions of LDL and modified LDL with mesangial cells and matrix . *Kidney. Int.*, **41**, 1161-1169.

GUTSTEIN DE and FUSTA V. (1999). Pathophysiology and clinical significance of atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovas. Res.*, **41**, 323-333.

GUYTON JR. (1994). The arterial wall and the atherosclerosis lesion. *Curr. Opin. Lipidol.*, **5**, 376-381.

H

HABENICHT A ; GLOMSET J and ROSS R. (1980). Régulation of cholesterol and mevalonic acid to the cell cycle in smooth muscle and swiss 3T3 cells stimulated to divide by platelet Derived Growth Factor. *J. Biol. Chem.* , **255**, 51-54.

HADJIISKY P ; ABOU HAÏLA A and BOURDILLON MC. (1979). Comportement morphologique et histochimique du tissu artériel des rats génétiquement normo-, hypo- et hyper cholestérolémiques à l'état normal et après régime hyperlipémiant. *Arterial wall.*, **4**, 111-133.

HADJIISKY P ; PEYRI N ; RENAIS J and SCEBAT L. (1980). Devenir de la lipoïdose aortique du rat 20 mois après l'arrêt du régime hyperlipémiant. *Pathol. Biol. (Paris).*, **28**, 427-434.

HADJIISKY P ; BOURDILLON MC ; and GROSGOGEAT Y. (1991). Modeles experimentaux d'athérosclérose (Apports, limites et perspectives). *Arch. Mal. Coeur.*, **84**, 1593-1603.

HADRAVA V ; RUSSO CR ; KRUPPA U ; LACOURCIERE Y ; TREMBLAY J and HAMET P. (1990). Intrinsic and extrinsic factors implicated in cell proliferation of vascular smooth muscle in hypertension and diabetes. *Arch. Mal. Cœur. Vaiss.*, **83**, 31-37.

HALILA R and PELTONEN L. (1984). Neutral protease clearing the N - terminal propeptide of type III procollagen : Partial purification and characterization of the enzyme from smooth muscle cells of bovin aorta. *Biochemistry.*, **23**, 1251-1256.

HALLORAM BG ; GRANGE JJ ; SO BJ and BAXTER BT. (1997). Macrophage products inhibit human aortic smooth muscle cell proliferation and alter alpha1 (I) procollagen expression. *Ann. Vasc. Surg.*, **11**, 80-84.

HAMES BD ; and GLOVER DM. (1988). Transcription and splicing. *Oxford. IRL. Press. Ltd.*

HAMLIN CR ; KOHN RC and LUSCHKIN JH. (1975). Apparent accelered aging of human collagen in diabetes mellitus. *Diabetes.*, **24**, 902-905.

HARAKI N ; HIGASHI T ; MORI T ; SHIBAYAMA R ; KAWABE Y ; KODAMA T ; TAKAHASHI K ; SHICHIRI M and HORIUCHI S. (1995). Macrophage scavenger receptor mediates uptake and

degradation of advanced glycation end products of the maillard reaction. *Eu. J. Biochem.*, **230**, 408-415.

HASHIMOTO S and DAYTON S. (1974). Cholesterol-esterifying activity of aortas from atherosclerosis-resistant and atherosclerosis-susceptible species. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **145**, 89-92.

HASHIMOTO S and DAYTON S. (1978). Stilmulation of acyl COA : cholesterol acyltransferase activity in rat liver microsomes by phosphatidyl choline. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **82**, 1111-1120.

HASHIMOTO S ; DAYTON S ; ALFIN SLATER RB ; BUI PT ; BAKER N and WILSON L. (1973). Characteristics of the cholesterol - esterifying activity in normal and athresclerotic rabbit aortas. *Circ. Res.*, **34**, 176-183.

HAY RI. (1986). Preservation and characterization. In "Animal cell culture. A practical approach." Freschney RI (ed). IRL PRESS. Oxford., p. 71-81.

HAYFLICK L. (1968). Human cells and aging. *Sci., Amer.*, **218**, 32-45.

HEDIGER MA ; CODAY MJ ; IKEDA TS and WRIGHT EM. (1987). Expression cloning and cDNA sequencing of the Na^+ / glucose co-tansporter. *Nature.*, **330**, 379-381.

HEDO J and SIMPSON IA. (1984). Internalization of insulin receptor in the isolated rat adipose cell. Demonstration of the vectorial disposition of receptor subunit . *J. Biol. Chem.*, **259**, 11083.

HENDRICK JP and HARTL FU. (1993). Molecular chaprone functions of heat - shock proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 349-384.

HERTZ J ; KOWAL RC ; GOLDSTEIN JL and BROWN MS. (1990). Proteolytic processing of 60 kd low density lipoprotein receptor related protein (LRP) occurs in a trans golgi compartment. *Embo. J.*, **9**, 1769-1776.

HIGASHI T ; SANO H ; SAISHJI T ; IKEDA K ; JINNOUCHI Y ; KANZAKI T ; MORIZAKI N ; RUVALA H ; SHICHIRI M and HORIUCHI S. (1997). The receptor for advanced glycation end products mediates the chemotaxis of rabbit smooth muscle cells. *Diabetes.*, **46**, 463-472.

HIGGINS PJ and BUNN HF. (1981). Kinetic analysis of the non enzymatic glycosylation of hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 256, 5204-5208.

HOBBS HH ; RUSSEL W ; BROWN MS and GOLDSTEIN JL. (1990). The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia : nutritional analysis of a membran protein. *Ann. Rev. Genet.*, **24**, 133-170.

HOD Y ; COOK JS ; WELDON SL ; SHOT JM ; WYNSHAW BA and HANSON RW. (1986). Differental expression of the genes for the mitochondral and cytosolic forms of phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 12, 202-203.

HOJIMA Y ; Mc KENZIE J ; VAN DER REST M and PROCKOP DJ. (1989). Type I procollagen N proteinase from chick embryo tendons. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.*, **260**, 15996-16003.

HOLMQUIST WR and SCHRODER KA. (1966). A new N - terminal blocking group involving a schiff base in hemoglobin. *Arc. Biochemistry.*, **5**, 2489-2503.

HOLVO ET and COLLEN D. (1997). Thrombosis and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.*, **8**, 320-328.

HORI O ; DU YAN S ; OGAWA S ; KUWABARA K ; MATSUMOTO M ; STAN D and SCHMIDT AM. (1996). The receptor for advanced glycation end – products has a central role in mediating the effects of advanced glycation end – products on the development of vascular disease in diabetes mellitus. *Nephrology. Dialysis. Transplantation.*, **11** supply, 13-16.

HRESKO RC ; KRUSE M ; SRUBE M and MUECKLER M. (1994). Topology of the GLUT 1 glucose transporter deduced from glycosylation scanning mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, **269**, 20482-20488

HULMES DJS ; BRUNS RR and GROSS J. (1983). On the state of aggregation of newly secreted procollagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **80**, 388-392.

HYNES RO. (1987). Integrins : a family of cell surface receptors. *Cell.*, **48**, 549-554.

I

IGAKI N ; SUKAI M ; HATA H ; OIMOMI M ; BABA S and KATO H. (1990). Effects of 3-deoxyglucosome on the maillard reaction. *Clin. Chem.*, **36**, 631.

IGARASHI M ; TAKEDA Y ; MORI S I ; SHIBASHI N ; KOMATSU E ; TAKAHASHI K ; FUSE T ; YMAMAMURA M ; KUBO K ; SUGIYAMA Y and SAITO Y. (1997). Supression of neointimal thickening by a newly developed HMG-CoA reductase inhibitor, BAYw6228, and its inhibitory effect on vascular smooth muscle cell growth. *Br. J. Pharmacol.*, **120**, 172-178.

INO K ; YOSHINARI M ; YAMAMOTO M ; KAKU K ; DOI Y ; ICHAKAWA K ; IWASE M and FUJISYAMA M. (1996). Effect of glycated collagen on proliferation of human smooth muscle cells in vitro. *Diabetologia.*, **39**, 800-806.

IRA GW ; RICHARD EH ; WETTENALL HKB and AYAMG N. (1972). Insulin and the control of protein synthesis in muscle. In. "*Insulin Action*" Ects. Iruing BF. 417-436.

ISHIGAMI M ; SWERTFEGER DK ; GRAUHOLM NA and HUI DY. (1998). Apolipoprotein E inhibits platelet - derived growth factor - induced vascular smooth muscle cell migration and proliferation by suppressing signal transduction and preventing cell entry to G1 phase. *J. Biol. Chem.*, **273**, 20156 - 20161.

J

JACOTOT B. (1993). Artères normales et athéroscléreuses. In : "*Athérosclérose*". Jacotot B. Eds Sandoz. 9-13.

JIMI S ; SAKU K ; VESUGI N ; SAKATA N and TAKEBAYASHI S. (1995). Oxidized low density lipoprotein stimulates collagen production in cultured arterial smooth muscle cells. *Atherosclerosis.*, **116**, 15-26.

JOHNSON MSC ; SVENSSON PA and HEBU K. (1998). Characterization and chromosomal localisation of rat SR-BI, a HDL lipoprotein receptor with a putative leucine - zipper domain and peroxysmal targueting sequence. *Endo.*, **139**, 72-80.

K

KADLER KE ; HOJIMA Y and PROCKOP DJ. (1987). Assembly of collagen fibrils de novo by clivage of the type I pC - collagen with procollagen C - proteinase. Assay of critical concentration demonstrates that collagen self - assembly is a classical example of an entropy driven process. *J. Biol. Chem.*, **260**, 15696-15701.

KAHN CR ; WHITE MF ; SHOELSON SE ; BAKER JM ; ARAKIE E ; SHEATHAM B ; CSERMELY P ; FOLLY F ; GOLDSTEIN BJ ; HUERTAS P ; ROTHEN. BERY PL ; SAAD MJA ; SIDDLE K ; SUN X ; WILDEN PA and YAMANDA K. (1993). The insulin receptor and its substrate : molecular determinants of early events in insulin action. *Rec. Prog. Horm. Res.*, **48**, 291-339.

KAHN CR ; BAIRD K ; FILIER JS ; GRUNFELD C ; HARMONT JT ; HARISSON LC ; KARISSON FA ; KASUGA M ; KING GL ; LANG UC and VAN OBERGEN E. (1981). Insulin receptors, antibodies and the mechanism of insulin action. *Rec. Prog. Horm. Res.*, **37**, 477-537.

KAHN AM ; HUSID A ; ALLEN JC ; SEIDEL CL ; and SONG T. (1997). Insulin acutely inhibits cultured vascular smooth muscle cell contraction by a nitric oxide synthase – dependent pathway. *Hypertension*., **30**, 928-933.

KANAI Y ; LEE WS ; YOU G ; BROWN D and HEDIGER MA. (1994). The human kidney low affinity Na+ / glucose co-transporter SGLT2. Delineation of the major renal reabsorptive mechanism for D-glucose. *J. Clin. Invest*., **93**, 397-404.

KARIM MA ; MILLER DD ; FARRAR MA ; ELEFTHERIADES E ; REDDY BH ; BRELAN CM and SAMAREL AM. (1995). Histo morphometric and biochemical correlates of arterial procollagen gene expression during vascular repair after experimental angioplasty. *Circulation*., **91**, 2049-57.

KATSUDA S ; OKADA Y ; MINAMOTO T ; ODA Y ; MATSUI Y and NAKANISHIT T. (1992). Collagens in humam atherosclerosis ; immunochemical analysis using collagen type specific antibody. *Arterioscler. Tromb*., **12**, 494-502.

KEARNEY D and FITZERALD D. (1999). The anti thrombotic effects of statins. *J. Am. Coll. Cardiol*., **33**, 1305-1307.

KEEN ET and JARRET. (1982). Complications of Diabetes. *London, Edward Arnold Pabl*,. 179-203.

KERN P. (1976). Matrices extracellulaires dans le diabète. *Ann. Med. Reims. XIII*., **2**, 109-111.

KERN P ; MOCZAR M and ROBERT L. (1979). Biosynthesis of skin collagens in normal and diabetic mice. *Biochemic. Med*., **30**, 189.

KERN P ; SEBERT B ; and ROBERT L . (1986). Increased type IV / type I Collagen ratio in diabetic human conjonctival biopsies. *Clin. Physiol. Biochem*., **4**, 113.119.

KESSLER E ; MOULD AR ; and HULMES DJS. (1990). Procollagen type IC - proteinase enhancer is a naturally occuring connective tissue glycoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun*., **173**, 81-86.

KEYS A. (1980). Seven countries. A multivariate anaysis of death and coronary heart disease. In "*Athérosclérose : inflammation et désinflammation".*

KHALKHAL A. (1990). Influence d'une thérapeutique nutritionelle hypocalorique et restrictive sur les troubles lipidiques et les complications vasculaires chez le rat des sables (P.o) rendu diabétique par un régime athérogène. Thèse Magister, USTHB, Alger.

KHALKHAL A ; DESCHAUX P ; DAHMANI Y and TROUTAUD D. (1992). Etude de la sensibilité des cellules β aux interleukines (IL-1b et IL-2) et à la thymosine (TF5) à l'action des îlots de Langerhans du rat des sables (*Psammomys obesus*) soumis aux régimes hypo- et hypercaloriques. *Congrés de Physiologie*. Nice. France.

KHEMICI D. (1985) Effets d'un glyclazide hypoglycémiant sur l'évolution du syndrome diabétique chez le rat des sables (*Psammomys obesus*) et les complications vasculaires. Thèse Magister, USTHB, Alger.

KJELLESTRÖM T and MALMQUIST J. (1984). Insulin effects of collagen and protein production in cultured human skin fibroblasts from diabetic and non diabetic subjects. *Horm. Metabol. Res*., **16**, 168-171.

KJELLSTRÖM T. (1986). Influence of glucose on collagen and protein production in cultured human skin fibroblast from diabetic and non diabetic subjects . *Diabetes Res*., **3**, 77-82.

KIELTY CM ; HOPKINSON I and GRANT ME. (1993). The collagen family : structure, assembly and organization in the extracellular matrix. In : connective tissue and its heritabledisorders. Molecular, genetic and medical aspects. Royce PM and Steinmann B. (Eds). New York, Wiley - Liss. Inc. 103-147.

KITAHARA M ; KANAKI T ; TOYODA K ; MIYAGOSHI C ; TANAKA S ; TAMAKI T and SAITO Y. (1998). NK - 104, a new devolopped HMG CoA reductase inhibitor, supress neointimal thickening by inhibiting smooth muscle cells growth and fibronectin production in ballon - injured rabbit carotid artery. *Jpn. J. Pharmacol.*, **77**, 117-128.

KIVIRIKKO KI and MYLLYLA R. (1979). Collagen glycosyl transferases. *Int. Rew. Connect. Tiss. Res*,. **8**, 23-72.

KIVIRIKKO KI and MYLLYLA R. (1982). Postranslationnal enzyms in the biosynthesis of collagens. Intracellular enzyms. *Methods enzymol.*, **144**, 96-114.

KIVIRIKKO KI. (1973). Urinary excretion of hydroxyproline in health and disease. *Int. Rev. Connective. Tissue. Res.*, **5**, 93-161.

KLEIN G ; KIBLER C ; SCHERMUTZKI F ; BROWN J ; MULLER CA and TIMPL R. (1977). Cell binding properties of collagen type XIV for human hematopoietic cells. *Matrix. Biol.* , **25**, 113-126.

KOCEIR EA. (1985). Diabète sucré chez le rat des sables. Etude "in vitro" du métabolisme des lipides du foie. Influence de la thérapeutique antidiabétique. Thèse Magister, USTHB, Alger.

KOCEIR EA ; DAHMANI Y and LEVERVE X. (2000). Control of gluconeogenesis in *Psammomys obesus* hepatocytes, NIDDM model, kinetics of the individual enzymes and the effect of glucagon. Association des Physiologistes., Liège, Belgique.

KOCHER D ; HÜTTNER I and GABIANI G. (1987). Aspects cellulaires de l'athérosclérose. In *Paroi artérielle et diabète"*. Camilleri JP ; Berry CL ; Fiessinger JN ; Bariety J. Ed. Flammarion.

KODAMA T ; FREEMAN M ; ROBERT L ; ZABREECKY J ; MATSUDAÏRA P and KRIEGER M. (1990). Type I macrophage scavenger receptor contains α - helical and collagen - like coiled coils. In *Atherosclérose*. Jacotot B. 107.

KOMABA A ; LI Q ; HARA H and YOKOYAMA S. (1992). Resistance of smooth muscle cells to assembly of high density lipoproteins with extracellular free apolipoproteins and to reduction of intracellularly accumulated cholesterol. *J. Biol. Chem.*, **267**, 1750-1756.

KOSCHINSKY T ; BÜNTING CE ; RUTTER R and GRIESS FA. (1987). Vascular growth factors and the development of macrovascular disease in diabetes mellitus. *Diabète et métabolisme.*, **13**, 318-325.

KOTHARI HV ; BONNER MJ and MILLER BF. (1970). Cholesterol ester hydrolase in homogenates and lysosomal fractions of human aorta. *Biochim. Biophys. Acta.*, **202**, 325-331

KRAHL ME. (1972). Effect of Insulin on synthesis of specific enzymes in various tissues . In : *Insulin action*. Eds. Irving BF. 461-486.

KRAUSE BR and NEWTON RS. (1989). ACAT inhibitors : preclinica pharmacologic profiles and implication for plasma lipid régulation and prevention of atherosclerosis. Elsevier science publishers B.V. Atherosclerosis VIII Gepaldi G et al, éditions., 707-710.

KRAUSE BR ; and NEWTON RS. (1991). Animal models for the evaluation of inhibitors of HMG - CoA reductase. *Adv. Lipids Res.*, **1**, 57-71.

KRAUSE BR ; BOUSLEY RF ; KIEFT KA and STANFIELD RL. (1992). Effect of the ACAT inhibition CI 976 on plasma cholesterol concentration and distribution in hamsters Fed - Zero and. Low cholesterol diets. *Clin Biochem.*, **25**, 371-377.

KRITCHEVSKY D and KOTHARI HV. (1973). Aortic cholesterol esterase : Studies in white carneau and Show Racer pigeons. *Biochim. Biophys. Acta.*, **326**, 489-491.

KRITCHEVSKY O and KHOTARI HV. (1978). Arterial enzymes of chlesteryl ester metabolism. *Adv. Lipid Res.*, **16**, 221.

KROMBOUT D. (1999). On the waves of the seven contries study. *Eur. Heart. J.*, **20**, 796-802.

L

LABAT ROBERT J . (1986). La fibronectine et son rôle dans les interactions cellules matrices. *CR. Soc. Bilol.*, **180**, 142-150.

LABAT-ROBERT J. (1992). Les intégrines. *Pathol. Biol.*, **40**, 883-888.

LABAT-ROBERT J. (1998). Cell - Matrix, alterations with aging, involvment in angiogenesis. *Pathol. Biol.*, **46**, 527-533.

LABAT-ROBERT J ; BIHARI-VARVA M and ROBERT L. (1990). Extracellular matrix. *FEBS. Lett.* , **268**, 386-393.

LABAT-ROBERT J ; KERN P and ROBERT L. (1991). Modification of biosynthesis of type I and type III collagen and fibronectin during diabetes and atherosclerosis. *Z. Gerontol.*, **24**, 66-69.

LABAT ROBERT J ; SZENDROÏ M ; GODEAU G and ROBERT L. (1985). Comparative distribution patterns of type I and type III collagen and fibronectin in human atherosclerotic aorta. *Path. Biol.*, **33**, 261-265.

LACRAZ S ; NICOD LP ; CHICHEPORTICHE R ; WELGUS HG and DAYER JM. (1995). IL10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J. Clin. Invest.*, **96**, 2304-10.

LAEMMLI UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, **227**, 680-685.

LAGROST LP and GAMBERT P. (1992). Transport reverse du cholestérol. Rôle de la protéine de transfert des esters de cholestérol. *C. R. Soc. Biol.*, **186**, 405-413.

LAHFA FB ; DAHMANI Y ; TROUTAUD D and DESCHAUX P. (1995). Nutritional influences on *in vitro* splenic lymphocyte proliferation in *Psammomys obesus. Cell. And Mol. Biol. Res.*, **41**, 387-390.

LAMOND AI. (1993). The spliceosome. *Bio. Essays.*, **15**, 595-603.

LANDSCHULTZ T ; PATHAK R ; RIGOTTI A ; KRIEGER M and HOBBS HH. (1996). Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroïdogenic tissues of the rat. *J. Clin. Invest.*, **98**, 984-995.

LAURENG J. (1987). Dynamic state of Collagen : Pathways of collagen degradation *in vivo* and their possible role in regulation of collagen mass. *Am. J. Physiol.*, **252**, 1-9.

LAWRENCE R ; HARTMANN DJ and SONENSHEIN GE. (1994). Transforming growth factor beta 1 stimulating type V collagen expression in bovine vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, **269**, 9603-9609.

LAYMAN DL ; EPSTEIN EH ; DODSON RF and TITUS JL. (1977). Biosynthesis of type I and type III collagens by cultured smooth muscle cells from human aorta. Natl. *Acad. Sci. USA*., **74**, 671-675.

LAYMAN DL and TITUS J. (1975). Synthesis of types collagen by human smooth muscle cells *in vitro*. Labo. *Invest*., **33**, 103-107.

LEAKE DS and PETERS TJ. (1982). Lipid accumulation in arterial smooth muscles cells in culture. *Atherosclerosis*. **44**, 275-291.

LEDET T. (1975). Diabetic macroangiopathy : *In vitro* study of the growth of aortic smooth muscle cells propagated in human serum from young juvenile diabetics. *Diabetologia*., **11**, 358.

LEDET T ; FISHER–DZOGA K and WISSLER RW. (1976). Growth of rabbit aortic smooth muscle cells cultured in média containing diabetic and hyperlipemic serum. *Diabetes*., **25**, 207-215.

LEE RT ; BERDITCHEVSKI F ; CHENG GC ; and HEMLER ME. (1995). Integrin - mediated collagen matrix reorganization by cultured human vascular smooth muscle cells. *Cric. Res*., **76**, 209-214.

LEE TS ; SALTSMAN KA ; OHASHI H and KING GL. (1989). Activation of protein kinase C by elevation of glucose concentration : proposal for a mechanism in the development of diabetic vascular complications. (inositol phospholipids/diacylglycerol/phosphatidic acid/glucose metabolism). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., **86**, 5141-5145.

LESOBRE B. (1994). Cardiovascular risks factors in type 2 diabetes. *Diab. Metabol*., **20**, 351-356.

LEUTENEGER M and BERTIN E. (1995). Diabetes mellitus and atherosclerosis. *Physio. Diab. Macroang*., **16**, 31-42.

LEWIS BS and HARDING JJ. (1990). The effects of aminoguanidine on the glycation of lens proteins. *Exp. Eye. Res*., **50**, 463.

LEWIS JC and TAYLOR RG. (1994). Localization of lipoprotein in pre- and post-transition atherosclerotic lesions following short-term incubation with [^{125}I] LDL. *Histochem. J*., **26**, 833-843.

LIBBY P and HANSSON GK. (1991). Involvment of the immune system in human atherogenesis : current knowldge and unanswered questions. *Lab. Ivest*., **64**, 5-15.

LIBBY P ; GENG YJ ; AIKAWA M ; SCHOENBECK V ; MACH F ; CLINTON SK ; SUKHOVA GK and LEE RT. (1996). Macrophage and atherosclerotic plaque stability. *Curr. Opin. In. lipid*., **7**, 330-335.

LIENHARD G ; SLOT J ; JAMES D and MUECKEIR M. (1992). L'absorption du glucose par les cellules. *Pour la Science*., **173**, 68-73.

LIGHT ND. (1982). Estimation of types I and III collagens in whole tissue by quantitation of CNBr peptides on SDS polyacrylamide gels. *Biochim. Biophys. Acta*. , **702**, 30-36.

LITTLE R ; ENGLAND J ; WIEDMEYER H ; MC KENZIE ; PETTITT D ; KNOWLER W and GOLDSTEIN D. (1988). Relationship of glycosylated hemoglobin to oral glucose tolerance. Implications for diabetes screening. *Diabetes*., **37**, 60-64.

LIU KZ ; RAMJIAWAN B ; KUTRYK MJ and PIERCE GN. (1991). Effects of oxidative modification of cholesterol in isolated low density lipoproteins on cultured smooth muscle cells. *Mol. Cell. Biochem*., **108**, 49-56.

LOFLAND HB ; CLARKSON TB and ARTOM C. (1960). Lipide synthesis in aorta preparations from atherosclerosis – susceptible or resistant pigeons. *Arch. Biochem. Biophys*., **88**, 105-109.

LOFLAND HB ; MOURY, DM and HOFFMAN CW. (1965). Lipid metabolism in pigeon aorta during atherogenesis. *J. Lipid. Res.*, **6**, 112-118.

LOPES VIRELLA MF ; KLEIN RL ; LYONS TT ; STEVENSON HC and WITZTUM JL. (1988). Glycosylation of LDL enhances cholesteryl ester synthesis in human Monocyte derived macrophages. *Diabetes.*, **37**, 550.

LUSCHER TF ; OEMAR BS ; YANG Z and NOLL G. (1995). Molecular medecine and gene therapy, the example of artherosclerosis and restenosis. *Schweitz. Med. Wochenschr.*, **125**, 2107-2121.

LUTTON C. (1990). Dynamique du cholestérol et des acides biliaires. *Reprod. Nutr. Dev.*, **30**, 869-876.

LYONS T. (1993). Glycation and oxidation. A role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.*, **71**, B26-B31.

M

MAC LEOD DC ; STRAWS BH ; DE JONG M ; ESCANED J ; UMANS VA ; VAN-SUYELEN RJ ; VERKEK A ; DE FEYTER PJ and SERRUYS PW. (1994). Proliferation and extracellular matrix synthesis of smooth muscle cells cultured from human coronary atherosclerotic and restenotic lesions. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **23**, 59-65.

MACEIRA - COELHO A. (1973). Aging and cell division. In. *Front. Biol.*, **1**, Eds. Karger, Basel, 46-77.

MACQUART F ; SZYMANOWICZ A ; CAMY R ; RANDOUX A and BOREL J. (1980). Rates of DNA and protein synthesis by fibroblasts culture in the presence of various glucose concentrations . *Biochimie.*, **62**, 93-97.

MAGGI E ; PERANI G ; FALASHI F ; FRATONI A ; MARTIGNONI A ; FINARDI G ; STEPHANO PL ; SIMEONE F and PAOLINI G. (1994). Autoantibodies against oxidised low density lipoproteins in patients with coronary disease. *Press. Med.*, **23**, 1158-1162.

MAHLEY PW ; INNERARITY TL ; BROWN MS ; HO YK and GOLDSTEIN JL. (1980). Cholesteryl ester. Synthesis in macrophages : Stimulation by βVLDL from cholesterol-fed animals of several species. *J. Lipid. Res.* , **21**, 970-980.

MAHTOUT S. (1981). Approche biologique d'un modèle expérimental pour l'étude du diabète chez le rat des sables (*Psammomys obesus*). Morphologie, histoenzymologie et ultraastructure de l'aorte et du foie après régimes hypo- et hypercalorique. Thèse 3ème Cycle, USTHB, Alger.

MAJORS AK and EHRHART LA. (1992). Cell density and proliferation modulate collagen synthesis and procollagen mRNA. levels in arterial smooth muscle cells. *Exp. Cell. Res.*, **200**, 168-174.

MALLAT Z ; BESNARD S and DURIEZ M. (1999). Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ. Res.*, **85**, e17-e24.

MARCHAND F. (1904). Uber urteriosklerose (arthero-sklerose). *Verhdig. Kongr. Im. Med.*, **21**, 23.

MARIANI TJ ; TRACKMAN PC ; KAGAN HM ; EDDY RL ; SHOWS TB ; BOYD CD and DEAK RL. (1992). The complete derived amino acid sequence of human lysyl oxidase and assignment of the gene to chromosomes. Extensive sequence homology with the murine RAS recision gene. *Matrix.*, **12**, 242-248.

MARQUIÉ G ; PETKOV P and DUHAULT J. (1980). Diabetic syndrome in sand rat (*Psammomys obesus*) with special reference to the pancreas. *Atherosclerosis.*, 47, 7-17.

MARQUIE G. (1980). Effets de divers agents antidiabétiques sur les troubles lipidiques, la stéatose hépatique et l'athérosclérose entrainés par des régimes athérogènes chez le lapin. Thèse d'état, Toulouse.

MARQUIE G ; DUFOUR P ; SEMMAR S ; MICHOUDET C ; KOCEIR EL ; AHMED BEY D ; BOUGUERRA S and MESSAOUDI S. (1982). Diabète sucré chez le rat des sables (*Psammomys obesus*). *Bull. Soc. Hist. Nat. Afr. Nord. Alger.*, **70**, 65-78.

MARQUIE G ; DUHAULT J ; HADJIISKY P ; PETKOV P and BOUISSOU H. (1991). Diabetes mellitus in sand rat (*Psammomys obesus*) : microangiopathy during development of the diabetic syndrome. *Cellular and Molecular Biology.*, **37**, 651-667.

MARQUIE G ; DUHAULT J and JACOTOT B. (1984). Diabetes mellitus in sand rats (*Psammomys obesus*). Metabolic pattern during development of the diabetic syndrome. *Diabetes.*, **33**, 438-443.

MARQUIE G , MENOUAR T ; SEBBART ; PERRAGGI MTh ; DOUSSET N ; SOLERA ML ; BENANI N ; GODE FROY A and RAE A. (1994). Préventions des lesions athéromateuses par ARTERODIET chez la rat des sables. Société Française d'athérosclérose.

MARTIN MJ ; HULLEY SB and BROWNER WS. (1987). Serum cholesterol, blood pressure and mortality : implications from a cohort of 361 .662 MEN ; *Lancet.* , **2**, 933- 936.

MATA P and LOPEZ FANNE A. (1996). Effect of dietary fat saturation on LDL and monocyte adhesion to human endothelial cells in vitro. Atheroscler. *Thromb. Vasc. Biol.*, **16**, 1347-55.

MAYNE R and BREWTON RG. (1993). New members of the collagen superfamily. *Curr. Op. Cell. Biol.*, **5**, 883-890.

MAYNE R and BURGESON RE. (Eds) (1987). Structure and function of collagen types. Orlando Academic Press, 1-317.

MC CALL AL ; VAN BUEREN AM ; HUANG L ; STENBIT A ; CELNIK E and CHANON MJ. (1997). Forebrain endothelium expresses GLUT 4, the insulin – responsive glucose transporter. *Brain. Research.*, **744**, 318-326.

MC CLAIN DA ; PATERSON AJ ; ROOS MD ; WEI X and KUDLOW JE. (1992). Glucose and glucosamine regulate growth factor gene expression in vascular smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.*, **89**, 8150-8154.

Mc CULLAGH KG ; DUANCE VC and BISHOP KA. (1980). The distribution of collagen types I, III and V in normal and atherosclerotic human aorta. *J. Pathol.*, **130**, 45-55.

Mc CULLAGH KG and EHRART LA. (1977). Enhanced synthesis and accumulation of collagen in cholesterol aggraved pigeon atherosclerosis. *Atherosclerosis.*, **26**, 341-352.

MC GUIRE PG ; WALKER-CAPRIOGLIO HM ; LITTLE SA and MC GUFFEE LJ. (1993). Isolation and culture of rat superior mesentric artery smooth muscle. *Cell. Dev. Biol.*, **29A**, 135-139.

MC PHERSON JD ; SHILTON BH and WALTON DJ. (1988). Role of fructose in glycation and crosslinking of proteins. *Biochemisty.*, **27**, 1901.

MEANS GE and CHANG MK. (1982). Non enzymatic glycosylarion of proteins. Structure and functions changes. *Diabetes.*, **31**, 1-4.

META U and KAUL D. (1990). Effect of trifluomerazine on DNA and LDL receptor synthesis in smooth muscle cells exposed to hyper cholesterolemic medium in vitro. *Biochem. Med. Metab. Biol.*, **43**, 175-81.

MEZDOUR H ; MONTE G and FRUCHART JC. (1994). Transfert of plasma cholestérol and atherosclerosis. *Ann. Biol. Clin. Paris*., **52**, 95-102.

MILLER LL and GRIFFIN EE. (1972). Direct effects of insulin on amino acid and protein metabolism in the isolated perfused rat liver. In : *Insulin action*. Fritz IB. Acad. Press. New York and London, 487-508.

MILLER GJ and MILLER NE. (1975). Plasma high density liproprotein concentration and development of ischaemic heart – disease. *Lancet*., **16**. 265-269.

MINORS LK ; MAHLBERG FH ; JEROME WG ; LEWIS JC ; ROTHBLAT GH and LICK JM. (1991). Lysosomal hydrolysis of lipids in a cell culture model of smooth muscle foam cells. *Exp. Mol. Pathol*., **54**, 159 – 171.

MINORS LK ; ROTHBLAT GH and GLICK JM. (1989). Triglycerides and cholesteryl ester hydrolysis in a cell model of smooth muscle foam cells. *J. Lipids. Res*., **30**, 189-197.

MOCZAR M and ROBERT L. (1976). Action of human hyperlipemic sera on the biosynthesis of intercellular matrix macromolecules in aorta organ cultures. *Paroi arterielle*. , **3**, 105-113.

MONNIER VM. (1990). Non-enzymatic glycosylation, the maillard reaction and the aging process. *J. Gerontology*., **45**, B 105.

MONNIER VM and CERAMI A. (1981). Non enzymatic browing in vivo : possible process for aging of long - lived proteins. *Science*., **211**, 491-493.

MONNIER VM ; KOHN RR. and CERAMI A. (1984). Accelerated age related browning of collagen in diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Scie. USA*., **81**, 583.

MONNIER VM ; VISHWANATH V ; FRANK KE ; ELMETS CA ; DAUCHOT P and KOHN RR. (1986). Relation between complications of type I diabetes mellitus and collagen-linked fluorescence. *N. Eng. J. Med*., **314**, 403.

MOOSE PRI ; CAMPBELL GR ; WANG ZL and CAMPBELL JH. (1985). Smooth muscle cells expression in human carotial arteries. I. Comparison of cells from diffuse intimal thickening adjacent to atheromatous plaque with those of the media. *Lab. Invest*., **53**, 556.

MORENO PR ; FALK E ; PALACIOS JF ; NEWEL JB ; FUSTER V and FALLON ST. (1994). Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation*., **90**, 775-778.

MORIN RJ ; EDRALIN GG and WOO JM. (1974). Esterification of cholesterol by subscellular fractions from swine arteries and inibition by amphypatic and polyanionic compounds. *Atheroscl*., **20**, 27-39.

MORTON LF and BARNES MJ. (1982). Collagen polymorphism in the normal and diseased blood vessel wall. Investigations of collagens types I, III and V. *Atherosclerosis*., **42**, 41-51.

MOSSAZ A and ASSAL J P. (1987). Aspects physiopathologiques et cliniques de l'angiopathie diabétique. In : *Paroi artérielle et diabète*. Camilleri JP ; Berry CL ; Fiessinger JN ; Bariety J. Ed. Flammarion.

MOULIN P ; BOURDILLON MC ; DE PARSCAN L ; PERROT L ; PONSIN G and BERTHEZENE F. (1987). High density lipoprotein alterations induced by bezafibiate in healty male volunteers. *Atherosclerosis*., **67,** 17-22.

MUECKLER M ; CARUSO C ; BALDWIN SA ; PANICO M ; BLENCH I ; MORRIS HR ; ALLARD WJ ; LIENARD GE and LODISH HF. (1985). Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science*., **229**, 941-945.

MUH JP and LEGRAND YJ. (1987). Matrices conjonctives vasculaires et hémostase dans l'angiopathie diabétique. In : *Maladies de la paroi artérielle*. Ed : Médecine - Sciences / Flammarion. Camilleri JP ; Berry CL ; Fiessinger JN ; Bariety J.

MUNRO JM and COTRAN RS. (1988). The pathogenesis of atherosclerosis ; atherogenesis and inflammation. In : *Encyclopédie de l'artère*. Bouissou H ; Julian M ; Pieraggi MTh. Vol.3, 29.

MYAKITA Z ; VLASSARA H ; CERAMI A and BUCALA A . (1992). Immunochemical detection of advanced glycosylation end products *In vivo*. *J. Biol. Chem.* , **267**, 5133-5138.

MYERS J and EMANUEL B. (1987). Chromosomal localization of human collagens gene. *Coll. Rel. Res.*, **7**, 149-159.

MYERS MGJ ; SUN XJ and WHITE MF. (1994). The IRS-I signalling system. *Trends. Biochem. Sci.*, **19**, 289-194.

MYLLYLA R ; PIHLJANIEMI T ; PAJUNEN L ; TURPEENNIEMI-HJANEN T and KIVIRIKKO KI. (1991). Molecular cloning of chick lysyl hydroxylase. Little homology in primary structure to the two types of subunit of prolyl 4 hydroxylase. *J. Bio. Chem.*, **266**, 2805-2810.

N

NAGATA K. (19). HsP47 : a collagen specific molecular chaperonne. In : *Path. Biol. Tibs.*, **21**, 23-26.

NAGLER A ; MIAO HO ; AINGORM H ; PINES M ; GENINA O and VLODOWSKY I. (1997). Inhibition of collagen synthesis, smooth muscle cell proliferation and injury induced intimal hyperplasia by halofuginone. *Arteriscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **17**, 194-202.

NAGORNEV VA and MAL'TESEVA SV. (1993). The cellular–molecular aspects of experimental atherosclerosis in rabbits. The charactenstic of the development of initial atherosclerotic lesions in the aorta. *Arkh. Patol.*, **55**, 64-69.

NAHMAN NS ; LEONHART KL ; COSIO FG and HEBERT CL (1992). Effect of high glucose on cellular prodiferation and fibronectin production by cultured human mesangial cells. *Kidn. Intern.*, **41**, 396-402.

NAKAI T ; TAKAI H ; TAMAI T ; OIDA K ; MAEDA H ; TAKAHASHI S and MIYABO S. (1991). Metabolism of apolipoprotein B48 containing triglyceride rich lipoprotein in non insulin dependent diabetes mellitus. *Prog. Lipid. Res.*, 30, 281-294.

NAPOLI C ; D'ARMIENTO FP and MANCINI FP. (1997). Fatty streak formation occurs in human aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of LDL and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerosis. *J. Clin. Invest.*, **100,** 2680-2690.

NAYLER WG. (1994). Therapeutic approches to the control of coronary atherosclerosis. *Basic. Res. Cardiol.*, **89** suppl, 137-143.

NELSON PR ; YAMAMURA S and KENT KC. (1997). Platelet – derived growth factor and extracellular matrix proteins provid a synergistic stimulus for human vascular smooth muscle cell migration. *J. Vasc. Surg.*, **26**, 104-112.

NEWBY AC and ZALTSMAN AB. (1999). Fibrous cap formation or destruction the critical importande of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovasc. Res.*, **41**, 323-333.

NIKKARI ST ; JARVELAINEN HT ; WIGHT TN ; FERGUSON M and CLOWES AW. (1994). Smooth muscle ccell expression of extracellular matrix genes after arterial injury. *Am. J. Pathol.*, **144**, 1348-1356.

NIMNI ME. (1991). Collagen, structure and function. In : *Encyclopedia of human biology*. Vol 2, Academic Press, Inc.

NISHIDE T ; MORISAKI N ; SHIRAI K ; SAITO Y and YOSHIDA S. (1992). Effect of conditioning of β–migrating very low density lipoprotein with macrophages on the accumulation of cholesteryl esters in smooth muscle cells. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **52**, 129-136.

NOÏVA R and LENNARZ WJ. (1992). Protein dissulfide isomerase. A multifuntional protein resident in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, **267**, 3553-3556.

O

O' BRIEN RM and GRANNER DK. (1991). Regulation of gene expression by insulin. *Biochem. J.*, **278**, 609-619.

OIMOMI M ; MASUDA S ; NAKAMICHI T ; NAEDIA Y ; HATA F ; KITAMURA T ; MATSUMOTO S ; HATANAKA H and BABA S. (1987). Accelered glycation of the aorta in diabetic rats. *Diab. Res. Clin. Prat.* , **4**, 23-26.

OKADA Y ; KADSUDA S ; MATSUI Y ; WATANABE H and NAKANISHI I. (1990). Collagen synthesis by cultured smooth muscle cells during spontaneous phenotypic modulation. *Acta. Pathol. Jpn.*, **40**, 157-164.

OLSEN BR. (1981). In "*Cell Biology of the extracellular matrix*"., Ed, Hay, Plenum Press, 139.

OMARI N ; DAHMANI Y and HADJ BEKKOUCHE. (1996). Etude histologique et histochimique de la glande hypophyse du rat wistar rendu diabétique par la streptozotocine. 64ème réunion de la société de Physiologie. Lille.

ORAM JF ; BRINTON EA and BIERMAN EL. (1983). Regulation of HDL receptor activity in cultured human skin fibioblasts and human arterial smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.*, **72**, 1611-1621.

ORAM JF ; CHAIT A and BIERMAN EL. (1985). Lipoprotein and cholesterol metabolism in cultured arterial smooth muscle cells. In : *Vascular Smooth muscle cells in culture*. Vol II. by Campbell J and Campbell GH. (1987). CRC Press.Inc. Boca. Raton., Florida.

ORAM JF ; CHAIT A and BIERMAN EL. (1987). Lipoprotein and cholesterol metabolism in cultured arterial smooth muscle cells. In : *Vascular smooth muscle in culture*. CRC Press.Inc. Boca. Raton., Florida.

ORAM JF ; JOHNSON CJ and BROWN TA. (1987). Interaction of high density lipoproteinwith its receptor on cultured fibroblasts and macrophages. *J. Biol. Chem.*, **262**, 2405-2410.

OTEY CA ; PAVALKO FM and BURRIDGE K. (1990). An interaction between alpha actinin and the beta 1 integrin subunit *in vitro*. *J. cell. Biol.*, **111**, 721-729.

OTHMANI MECIF K. (1989). Etude morphologique, histochimique et histoenzymologique du rein de *Psammomys obesus* normal, diabétique et soumis aux traitements antidiabétiques. Thèse Magister, USTHB, Alger.

OUCHTERLONY O. (1958). Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Progress in allergy.*, **5**, 1-78.

P

PAGE IH and BERNHARDT WG. (1935). Cholesterol induced atherosclerosis. *Arch. Path. USA.*, **19**, 530.

PALINSKY W ; ROSENFIELD M and YLÄ HERTUALA S. (1989). LDL undergoes oxidative modification *in vivo*. *Proc. Nath. Acad. USA*., **86**, 1372-1376.

PARRA HJ ; MEZDOUR H ; GHALIM N ; BARD JM and FRUCHART JC. (1990) Differential electroimmunoassay of human lp AI lipoprotein particles on ready to use plates. *Clin. Chem*., **36**, 1431-14335.

PESSIN JE and BELL GI. (1992). Mammalian facilitative glucose transporter family : structure and molecular regulation. *Ann. Rev. Physiol*., 54, 911-930.
PETERKOFSKY B and ASSAD R. (1979). Localization of chick embryo limb bone microsonal lysyl hydroxylase at intracisterrnal and intra-membranes sites. *J. Biol. Chem*., **254**, 4714-4720.

PETERKOFSKY B ; CHOJKIER M and BATEMAN J. (1982). Determination of collagen synthesis in tissue and cells culture system in : *Immunochemistry of the extracellular matrix*. Ed H Furthmayr MD, CRC Press, **2**, Application, 19-48.

PETERKOFSKY B. (1991). Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of collagen synthesis in scurvy. *Am. J. Clin. Nutr*., **54**, 11355-11405.

PETERS JJ ; MULLER M and DE DUVE C. (1972). Lysosomes of the arterial W.I. Isolation and subcellular fractionation of cells from normal rabbit aorta. *J. Exp. Med*., **136**, 1117 – 1139.

PETERS TJ and DE DUVE C. (1974). Lysosomes of the arterial wall. II. Subcellular fractionation of aortic cells from rabbits with experimental atheroma. *Exp.Mol. Pathol*., **20**, 228-256.

PHILLIP J ; COZZI BS ; ROSST ; LYON MD ; HARRY R; DAVIS PH D ; SAMES - SYTORA BS ; SEYMOUR GLAGAR MD ; CHRISTOPHE K and ZARINS MD. (1988). Aortic wall metabolism in relation to susceptibility and resistance to experimental atherosclerosis. *J. Vasc. Surg*., **7**, 706-714.

PIE JE and SEILLAN C. (1992). Oxysterols in cultured bovine aortic smooth muscle cells and in the monocyte-Like cell line U937. *Lipids*., **27**, 270-4.

PIETILÄ K and NIKKARI T. (1980). Enhanced synthesis of collagen and total protein by smooth muscle cells from atherosclerotic rabbit aorta in culture. *Atherosclerosis*. , **37**, 11-19.

PINDERSKI - OSLUND LJ ; HEDRICK CC and OLIVERA T. (1999). Interleukin-10 blocks atherosclerotic events *in vitro* and *in vivo*. *Atheroscler*. *Thromb. Vasc. Biol*., **19**, 2847-28453.

PINSARD D ; CHADENAS D ; WALLET T ; VILLE NEUVE A and AUMAITRE S. (1983). Microangiopathie diabétique. Données actuelles. *Reine de Med. de Tours*., **17**, 1096-1100.

POWEL RJ ; HYDOWSKI J ; FRAN RO ; BARGAVA J and SAMPIO BE ; (1996). Endothelial cell effect on smooth muscle cell collagen synthesis. *J. Surg. Res*., **69**,113-118.

PREULER JD ; PHARE SM ; IANNUCCI AR and ODORECK MJ. (1996). Differential Inhibitory effects of antidiabetic drugs on arterial smooth muscle cell proliferation. *Am. J. Hypert*., **9**, 188-192.

PRICCI F ; PUGLIESE G ; PUGLIESE F ; MEME E ; ANDREANI D ; GALLI G ; CASINI A. ROTELLA CM and DI MARIO U. (1992). Mechanisms of glucose induced extracellular matrix overproduction by cultured vascular cells. *Acta. Diabetol*., **29**, 264-267.

PROCKOP DJ ; KIVIRIKKO KI ; TUDERMAN L and GUZMAN NA. (1979). The biosynthesis of collagen and its disorders. *N. Engl. J. Med*., **301**, 13-23.

PROCOCK J ; SHAPER AG ; PHILLIPS AN ; WALKER M and WITEHEAD TP. (1986). HDL cholesterol is not a mayn risk factor for is chemic heart disease in British men. *Br. Med. J*., **292**, 515-519.

PROUDLOCK JW and DAY AJ. (1972). Cholesterol esterifying enzymes of atherosclerotic rabbit intima. *Biochim. Biophys. Acta*., **260**, 716-723.

PROUDLOCK S ; DAY AJ and NAUGHTON JM. (1973a). Lipid composition and metabolic activity of subcellular fraction isolated from rabbit atherosclerotic lesions. *Exp. Mol. Pathol*., **19**, 389-491.

PROUDLOK JW ; DAY AJ and TUME RK. (1973b). Cholesterol-esterifying enzymes of foam cells isolated from atherosclerotic rabbit intima. *Atherosclerosis*., **18**, 451-457.

Q

QUINN MT ; PARATHASARATHY S and STEINBERG D. (1988). Lysophosphaticlylcholine : a chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. , **85**, 2805-2809.

R

RABES JP ; VARRET M and BOILEAU C. (1997). L'hypercholestérolémie familiale 25 ans après. II. Formes non liées au récepteur des LDL. *Med. Sci*. , **13**, 1409-1418.

RADER DJ, CASTRO GR ; ZECHLA ; FRUCHART JC and BREWER HB. (1991). *In vivo* metabolism of apolipoprotein AI on High density lipoprotein particles LP AI and LP AI : AII. *J. lipid. Res*., **32**, 1849-59.

RAHBAR S ; PAULSEN E and RANNEY HM. (1986). Studies of hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Diabetes*., **18**, 332-335.

RAMIREZ F. (1989). Organization and evolution of the fibrillar collagen genes. In : *Collagen. Molecular Biology*, Olsen BR and Nimni ME, (eds) Roca Raton : CRC Press. Inc. 21-30.

RAUTERBURG J ; JAEGER E and ATHAU M. (1993). Collagen in atherosclerotic vessel wall lesions. *Curr. Top. Pathol*., **87**, 163-192.

RECHLER MM ; PODSKALNY JM ; GOLDFINE ID and WELLS CA. (1974). DNA Synthesis in human fibroplasts : stimulation by insulin and by nonsupressible insulin - Like activity (NSILA-S). *J. Clin. Endocrinol. Metab*., **39**, 512-521.

RECKTER MD and GORDON D. (1994). Cell prolifration and collagen synthesis are two independant events in human atherosclerotic plaques. *J. Vasc. Res*., **31**, 280-286.

REISER KM. (1991). Non enzymatic glycation of collagen in aging and diabetes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*., **196**, 17-29.

RESNICK N ; YAHAV H; SCHUBERT S ; WOLFOVITZ E and SHAY A. (2000). Signalling pathways in vascular endothelium activated by shear stress : relevance to atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol*., **11**, 167-177.

RICH A and CRICK FHC. (1961). The molecular structure of collagen. *J. Mol. Biol*., **3**, 483-506.

RICHARD JL ; DUCIMETIERE P ; BONNAUD G ; CLAUDE JR ; LELLOUCH J ; SCHWARTZ D and DI MATTEO J. (1977). Incidence et évaluation du risque de maladie coronarienne : l'étude prospective parisienne. *Arch. Mal. Coeur*., **70**, 531-538.

RIMM EB ; STAMPFER MJ ; ASHERIO A ; GIOVANNUCI E ; COLDITZ GA and WWILLETT WC. (1993). Vitamine E, consumption and the risk of coronary heart diseasa in men. *N. Engl. J.* **Med**., **328**, 1450-1456.

ROBBINS SP and BAILEY AJ. (1972). Age related changes in collagen : the identification of reductible lysine - carbohydrate condensation products. *Bioch. Biophys. Res. Commun*., **48**, 76-84.

ROBERT AM ; GODEAU G ; SCHOVAERT BROSSAULT D ; LESTY C and LAY B. (1986). Initiation à la morphométrie. *CNRS, administration déléguée, 3ème circonscription, formation permanente.?*

ROBERT AM and ROBERT L. (1980). Biochemisty of normal and pathological connective tissues. Vol.1 et 2. Créteil : Edition du CNRS.

ROBERT L. (1971). Les glycoproteines tissulaires. Hhyp othèses concernant les membranes basales au cours du diabète. *Presse med.*, **79**, 2277 – 2281.

ROBERT L. (1983). Mecanismes cellulaires et moléculaires du vieillissement. Vol.5. Paris. Eds. Masson.

ROBERT L. (1985). The extracellular matrix of the vascular wall and its role in atherogenesis. *Pathol. Biol.* , **33**, 243-244.

ROBERT L. (1986). Le vieillissement du tissu conjonctif. Aspects moléculaires et cellulaires. *Phlébologie.*, **39**, 783-790.

ROBERT L. (1993). Pathogénie de l'athérosclérose. In : *Athérosclérose*. 49.

ROBERT L. (1998). Extracellular matrix : *Introduction. Path. Biol.*, **46**, 489-490.

ROBERT L and BIREMBAUT TP. (1987). La matrice extracellulaire de la paroi artérielle. In : *Maladies de la paroi artérielle*. Ed : Médecine-Sciences / Flammarion. Camilleri JP ; Berry CL ; Fiessinger JN ; Bariety J.

ROBERT L and GRELING H. (1981). Pharmacologie cellulaire et moléculaire des maladies du tissu conjonctif. Journées franco-allemandes de Rhumatologie, Aix-la-chapelle, Reims : Boehringer - Ingelheim.

ROBERT L and HORMNEBECK W. (1979). Elastin and elastase I, II. CRC. Press. Boca. Raton. USA.

ROBERT L ; JACOB MP ; FRANCES C ; GODEAU G and HORNEBECK W. (1984). Interaction between elastin and elastase and its role in the aging arterial wall, skin and other connective tissue. *Mech. Age. Dev.*, **28**, 155-173.

ROBERT L ; JACOB MP and LABAT-ROBERT J. (1992). Cell matrix interactions in the genesis of arteriosclerosis and atheroma. Effect of aging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **673**, 331-341.

ROBERT L and LABAT-ROBERT J. (1989). Morphogenesis, aging and repair of the connective tissues. *Facial. Plastic. Surgery.*, **6**, 1-7.

ROBERT L ; MOKZAR M and MOCZAR E. (1985). Methods of connective tissue research. *Front. Matrix. Biol.*, **10**. 143-170.

ROBERT L and PENARANDA FS. (1953). Sur l'interaction des aldehydes, reductones et des acides aminés et proteines. II. Cinétique de l'interaction des acides aminés et de l'acétaldéhyde, suivie par la chromatographie et l'ionophorèse sur papier. *Bull. Sté. Chim.*, **35**, 8791-8799.

ROBERT L ; RIVAULT A ; MOCZAR M ; MISKULIN M and ROBERT AM. (1976). Diabetes and connective tissue : demonstration of deregulation of the biosynthesis of the intercellular matrix using a biopsie method. *J. Annu. Diabetol. Hôtel. Dieu.*, 35-44.

ROBERT L and ROBERT B. (1970). Exposés. *Ann. Biochimie. Med.*, **30**, 189.

ROBERT LJ and TAYLOR SI. (1972). Influence of insulin, epinephrine and substrates on pyruvate deshydrogenase activity of adipose tissue. In : *Insulin action*. Fritz IB. Acad. Press. New York and London. 415-436.

ROBERT L and PETERSZEGI G. (1998). Aging and matrix biology. *Pathol. Biol.*, 46, 491-495.

ROLFE BE ; CAMPBELL JH ; SMITH NJ ; CHEONG MW and CAMPBELL GR. (1995). T Lymphocytes affect smooth muscle cell phenotype and proliferation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. **15**, 1204-1210.

ROMANIC AM ; ADACHI E ; HOJIMA Y ; ENGEL J and PROCKOP DJ. (1992). Polymerisation of PN collagen I and copolymerisation of PN collagen I with collagen I. A kinetic, thermodynamic and morphologic study. *J. Biol. Chem.*, **167**, 22265-22271.

ROMANIC AM ; ARLETH AJ ; WILLETTE RN and OHLSTEIN EH. (1998). Factor XIIIa cross links lipoprotein (a) with fibrinogen and is present in human atherosclerotic lesions. *Circ. Res.*, **83**, 264-269.

LOPEZ KARPOVITCH X ; ROSENKOVITCH E ; BEN BASSET H and IZAK G. (1980). Structure and functional alterations in lymphoctes induced by cryopreservation. *Cryobiology.*, **17**, 12-17.

ROSENBERG H ; MODRAK JP and HASSING JM. (1979). Glycosylated collagen. *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, **91**, 498-551.

ROSENFELD ME and ROSS R. (1990). Macrophage and smooth muscle cell proliferation in atherosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Atheroscl.*, **10**, 680-687.

ROSS R. (1971). The smooth muscle cell. II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J. Cell. Biol.*, **50**, 172-186.

ROSS R. (1986). The pathogenesis of athresclerosis. *N. Engl. J. Med.*, **314**, 488-500.

ROSS R. (1992). The process of atherogenesis cellular and molecular interaction : From experimental animal models to humans. *Diabetologia.*, **35** Suppl, S34-S40.

ROSS R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis : a perspective for the 1990. *Nature.*, **362**, 801-809.

ROSS R. (1995). Cell biology of atherosclerosis. Ann. *Rev. Physiol.*, **57**, 791-804.

ROSS R. (1999). Atherosclerosis : an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.*, **340**, 115-126.

ROSS R and GLOMSET J. (1973). Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell. *Science.*, **180**, 1332-1339.

ROSS R and GLOMSET J. (1976). The pathogenesis of atherosclerosis. Part 1. *N. Engl. Med.*, **295**, 369-377.

ROSS R and GLOMSET J. (1976). The pathogenesis of atherosclerosis. Part. 2. *N. Engl. Med.*, **295**, 420-428.

ROTH M ; EICKEBERG O ; KOHLER E ; ERNE P and BLOCK LH. (1996). Ca 2^+ channel blockers modulate metabolism of collagens within the extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Scie. USA.*, **93**, 5478-5482.

ROTHMAN JE. (1988). Signal peptide recognition GTP and methionine bristles. *Nature*., **340**, 433-434.

ROUSSELLE P and GARONNE R. (1998). Collagènes et laminines : quels messages pour quelles cellules?. *Path. Biol*,. **46**, 543-554.

RUCKMAN JL ; LUVALLE PA ; HILL KE ; GIRO MG and DAVIDSON JM. (1994). Phenotypic stability and variation in cells of the porcine aorta : collagen elastin production. *Matrix, Biol*., **14**, 135-145.

RUDDERMAN N ; WILLIAMSON J and BROWONLEE M. (1992). Glucose and diabetic vascular disease. *Faseb J*., **6**, 2905-2914.

RUDELL LL ; PARKS JS ; JOHNSON FL and BABIACK J. (1986). Low density lipoprotein in atherosclerosis. In : "*Encyclopédie de l'artère*". Bouissou H ; Julian MTh. Tome 3. 29.

RUDNEY H and RUSSEL C. (1986). Regulation of cholesterol biosynthesis. *Am. Rev. Nutr*. , **6**, 245-272.

RUSSEL DW ; YAMAMOTO T ; SCHNEIDER WJ ; SLAUGHTER CJ ; BROWN MS and GOLDSTEIN JL. (1983). cDNA cloning of the bovine low density lipoprotein receptor : feedback regulation of a receptor mRNA. *Proc. Natl. Acad. Scie. USA*., **80**, 7501.

RYAN MC and SANDAL LJ. (1990). Differential expression of a cystein-rich domain in the amino-terminal propeptide of type III (cartilage) procollagen by alternative splicing of mRNA. *J. Biol. Chem*., **265**, 10334-10339.

S

SAGE H ; CROUCH E and BORNSTEIN P. (1979). Collagen synthesis by bovine aortic endothelial cells in culture. *Biochemistry*., **18**, 5433-5442.

SAKATA N ; MENG J ; JIMI S ; SEGAWA M and TAKEBAYASHI S. (1995). Aging of aorta and atherosclerosis. Role of monenzymatic glycation of collagen. *Nippon. Ronen. Igakkai. Zasshi*., **32**, 336-343.

SALE EM ; ATKINSON PG and SALE GJ. (1995). Requirement of MAP kinase for differenciation of fibroblasts to adipocytes, for insulin activation of p90S6 kinase and for insulin or serum stimulation of DNA synthesis. *Embo. J*., **14**, 674-684.

SALE FO ; MARCHESINI S ; FISHMAN PH and BERRA B. (1984). A sensitive enzymatic essay for determination of cholesterol in lipids extracts. *Anal. Biochem*., **147**, 347-350.

SALTIS J ; HABBERFIELD AD ; EGAN JJ ; LANDOS C ; SIMPSON IA and CUSHMAN SW. (1991). Role of protein kinase C in the regulation of glucose transport in the rat adipose cell. Translocation of glucose transporters without stimulation of glucose transport activity. *J. Biol. Chem*., **266**, 261-267.

SANDERS SL and SCHECKMAN R. (1992). Polypeptide translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem*., **267**, 13791-13794.

SANDERS M. (1994). The molecular and cellular concepts in atherosclerosis. *Pharmacol. Ther*., **61**, 109-153.

SANTALUCIA T ; CAMPS M ; CASTELLO A ; MUNOZ P ; NUEL A ; PALACIN M ; ZORZANO A. (1992). Developmental regulation of GLT-1 (erythroid/Hep2) and GLUT-4 (muscle/fat) glucose transporter. Expression in rat heart, skeletel muscle and brown adipose tissue. *Endocrinology*., 130, 837-846.

SARTORE S ; CHIAVEGATE A ; FRANCH R ; FAGGIN E and PAULETTE P. (1997). Myosin gene expression and cell phenotypes in vascular smooth muscle during. development, in experimental models, and in vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **17**, 1210-1215.

SAXENA K and SHIPLEY GG. (1997). Structural studies of detergent solubilized and vesicle reconstitue a low density lipoprotein (LDL) receptor. *Biochemistry.*, **36**, 15940-15948.

SAYESKI PP and KUDLOW JE. (1996). Glucose metabolism to glucosamine is necessary for glucose stimulation of transforming growth factor α□gene transcription. *J. Biol. Chem.* , **271**, 15237-15243.

SCALLEN TJ and SANGHVI A. (1983). Regulation of three key enzyme in cholesterol metabolism by phosphorylation – dephosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Scie. USA.*, **80**, 2477-2480.

SCHLEICHER E and WIELAND OH. (1981). Spécific quantitation by HPLC of protein (lysine) band glucose in human serum albumin and other glcycosylated proteins. *J.Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **19**, 81-87.

SCHMIDT AM ; HORI O ; CAO-R ; SHI DU Y ; BRETT J ; WANTIER JL ; OGAWA S ; KUWABARA K ; MATSUMOTO M and STERN O. (1996). RAGE : A novel cellular receptor for advanced glycation end products. *Diabetes.*, **45**, S77-S80.

SCHNIDER SL and KOHN RR. (1980). Glycosylation of human collagen in aging and diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.*, **66**, 1179-1181.

SCHNIDER SL and KOHN RR. (1982). Effects of diabetes mellitus on the solubility of collagen from human skin, tracheal cartilage and dura mater. *Exp. Gerotol.*, **17**, 185-194.

SCHNEIDER WJ. (1989). The low density liproprotein receptor. *Biochem. Biophys. Acta.*, **988**,303-317.

SCHNEIDER DJ and SOBEL BE. (1997). Determinants of vascular disease in patients with type II diabetes and their therapeutic implications. *Clin. Cardiol.*, **20**, 433-440.

SCHREIBER BM ; JONES HV ; TOSELLI P and FRANZBLANC. (1992). Long-term treatment of neonatal aortic smooth muscle cells with beta VLDL induces cholesterol accumulation. *Atheroscl.*, **95**, 201-210.

SCHROFF B ; SMITH T ; NORRIS K ; PILLEGI R and SAUK JJ. (1993). HsP47 is localized to regions of type I collagen production in developing murine femurs and molars. *Connect. Tissue. Res.*, **29**, 273-286.

SCHULTZ D and HARRISON DG. (2000). Quest for fire : seeking the source of pathogenic oxygen radicals in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **20**, 1412-1413.

SCHUPPAN D ; SCHMID M ; SOMASUN DARAM R ; ACKER MANN R ; RUEHL M ; NAKAMURA T and RIECKEN EO. (1998). Collagens in the liver extracellular matrix bind hepatocyte grouth factors . *Gastroenterology.*, **114**, 139-152.

SCHWAITZ SM ; CAMPBELL GR and CAMPBELL JH. (1986). Replication of smooth muscle cell in vascular disease. *Circ. Res.*, 58, 427-444.

SCHWARTZ E ; BIENKOWSKY RS and COLTOFF-SCHILLER B. (1982). Changes in the components of extracellular matrix and in growth properties of cultured aortic smoothmuscle cells upon ascorbate feeding. *J. Cell. Biol.*, **92**, 462-470.

SCOTT DM ; HARWOOD R ; GRANT ME and JACKSON DS. (1977). Characterization of the major collagen species present in porcine aorta and the synthesis of teir precursors by smooth muscle cells in culture. *Connect. Tissue. Res.* , **5**, 7-13.

SHAKLAI N ; GARLICK RL and BUNN HF. (1984). Non-enzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function. *J. Biol. Chem.*, **259**, 3812.

SHE MP ; XIA RY ; RAN BF and WONG ZL. (1990). High density lipoproteins and prevention of experimental atherosclerosis with special reference to tree shrews. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **598**, 339-351.

SHOEMAKER JK and BONEN A. (1995). Vascular actions of insulin in health and disease. *Can. J. Appl. Physiol.*, **20**, 127-154.

SIMONS J and VAN DEN BROCK C. (1970). Comparison of aging *in vitro* and *in vivo* by means of cell size analysis using a coulter counter. *Gerontol.*, **16**, 340-351.

SIMPSON IA ; CUSHMAN JW ; EGAN JJ ; HABBERFIELD AD ; LANDOS C ; MISHINAURA H and SALTIS J. (1990). Hormonal regulation of glucose transport in rat adipose cells. *Biochem. Soc. Transac.*, **18**, 1123-1124.

SIPERSTEIN MD ; CHAIKOFF IL and CHERNICK SS. (1951). Significance of endogenous cholesterol in arteriosclerosis : synthesis in arterial tissue. *Science.*, **113**, 747-749.

SKALLI O ; BLOOM WS ; ROPPAZ P. AZZABONE B and GABBIANI G. (1986). Cytoskeletel remodeling of rat aortic smooth muscle cells *in vitro*. Relation ship to culture conditions and analogies to *in vivo* situations. *J. Submicrosc. Cyt.*, **18**, 481-493.

SLOT JW ; GUCZE HJ ; GIGENGACK S ; LIENKARD GE and JAMES DE. (1991). Immunolocalization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat. *J. Cell. Biol.*, 113, 125-135.

SMITH EB. (1974). The relationship between plasma and tissue lipids in human atherosclerosis . *Adv.Lipid. Res.*, **12**, 1-49.

SOBOLEWSKI K ; WALANSKA M ; BANKAWKI E ; GACHO M and GLOWINSKI S. (1995). Collagen, elastin and GAG in aortic aneuvrysms. *Acta. Biochem. Pol.* , **42**, 301-307.

SOWERS J. (1992). Insulin resistance, hyperinsulinemia, dyslipidemia, hypertension and accelered atherosclerosis. *J. Clin. Pharmacol.*, **32**, 529-535.

SPIRO RG. (1976). Search for a biochemical basis of diabetic microangiopathy. *Diabetologia.*, **12**, 1.

SPRINKLE DJ ; RYMASZEWSKI Z ; BUDLOWSKI S ; STEVENS C ; YUNKER R and SUBBIAH MTR. (1987). Studies on aorta during development. II. Differences in ontogeny of the key enzymes involved in cholesteryl ester synthesis and hydrolysis in rabbit aorta . *Atheroscl.*, **67**, 71-80.

ST CLAIR RW and LOFLAND HB. (1971). Uptake and esterification of exogenous cholesterol by organ cultures of normal and atherosclerotic pigeon aorta. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **138**, 632-637.

ST CLAIR RW ; LOFLAND HB and CLARKSON TB. (1968). Composition and synthesis of fatty acids in atherosclerotic aortas of the pigeon. *J. Lipid. Res.*, 9, 739-747.

ST CLAIR RW ; LOFLAND HB and CLARKSON. TB. (1969). Influence of atherosclerosis on the composition, synthesis, and esterification of lipids in aortas of squirrel monkeys (*saimiri sciureus*). *J. Atheroscler. Res.*, **10**, 193-206.

STAMPFER MJ ; HENNKENS CM ; MANSON JE and GOLDITZ GA. (1993). Vit E, consumption and the risk of coronary heart disease in women. *N. Engl. J. Med.*, **328**, 1444-1449.

STANDBERG TE ; VANHANEN H and TIKKANEN MJ. (1999). Effects of statines on C-reactive protein in patients with coronary disease. *Lancet*., **353**, 118-119.

STARY HC ; CHANDLER AB ; DINSMORE RE ; FUSTER V ; GLOV S ; INSUL WJR ; ROSENFIELD ME ; SCHWARTZ CJ ; WAGNER WD and WISSLER RE . (1995). A definition of advanced types of atherosclerotic lesion and a histological classification of atherosclerosis . *Circulation*. , **92**, 1355-1374.

STEINBERG D ; PARTHASARATHY S ; CAREWW TE ; KHOO JC and WITZIUM JC. (1989). Modification of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med*., **320**, 915-924.

STEINBRECHER UP. (1999). Receptors for oxidized low density lipoprotein. *Biochim. Biophys*. *Acta*., **1436**, 279-298.

STEMME S ; FABER B ; HOLM J ; WIKLND O ; WITZIUM JL and HANSON GK. (1995). T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidizea low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., **92**, 3893-3897.

STENDER S and HJELMS E. (1988). *In vivo* transfert of cholesteryl ester from high and low density plasma lipoproteins into human aortic tissue. *Atheroscl*., **8**, 252-262.

STITT AW ; LI YM ; GARDINER TA ; BUCALA R ; ARCHER OB and VLASSARA H. (1997). Advanced glycation end products (AGES) co-localize with AGE receptors in the retinal vasculature of diabetic and of AGE–infused rats. *Am. J. Pathol.,* **150**,523-531.

STOUT RW. (1968). Insulin stimulated lipogenesis in arterial tissue in relation to diabetes and atheroma. *Lancet*., **2**, 702-703.

STOUT RW. (1969). Insulin stimulation of cholesterol synthesis tissue. *Lancet*., **2**, 467.

STOUT RW. (1970). Insultin stimulation of cholesterol synthesis by arterial tissue. *Lancet*. ,**1**, 248.

STOUT RW. (1975). The effect of insulin on the incorportion of D-glucose- ^{14}C into the lipids of the rat aorta *in vivo*. *Horm. Metab Res*., **7**, 31-34.

STOUT RW. (1979). Diabetes and atherosclerosis the role of insulin. *Diabetologia*., **16**, 141-150.

STOUT RW ; BIEPMANE L and ROSS R. (1975). Effect of insulin on the modification of cultured primate arterial smooth muscle cells . *Circ*., **36**, 219-327.

SUCKLING KE and STANGE EF. (1985). Role of Acyl CoA Cholesteryl Acyl Transferase in cellular cholesterol metabolism. *Atheroscl*., **89**, 183-190.

SUDHOF TC ; GOLDSTEIN JL ; BROWN MS and RUSSEL W. (1985). The LDL receptor gene. A mosaic of exons shared with different proteins. *Science*., **228**, 815-822.

SUN XJ ; ROTHENBERG P ; KAHN CR ; BECKER JM ; ARAKI E ; WILDEN DA ; CAHILL DA ; GOLDSTEIN BJ and WHITE MF. (1991). Structure of insulin receptor substrate receptor substrate IRS -1 definess a unique signal transduction protein. *Nature*., **352**, 7377.

T

TABACICK C ; ALIAN S and SULTAN C. (1985). Inhibition post HMG CoA regulation and relaties to cell growth of cholesterol biosynthesis in cultured human skin fibroblasts. *Biochim. Biophys*. *Acta*., **837**, 152.

TABACICK C ; ALIAU S and SAINTE MARIE J. (1987). Regulation of cholesterol biosynthesis at a stage after the HMG CoA step in normal and leukemic (L2C) lymphocytes. *Biophys. Acta*., **921**, 405.

TABACICK C ; VALENTIN JP ; ALIAN S and DESCOMPS B. (1991). Active cholesterol biosynthesis in cultured aortic smooth muscle cells : evolution during the life span of the culture. *Atheroscl.*, **86**, 123-137.

TAKAHARA H ; HIRAYOSHI K ; KUDO H ; SAGA S and NAGATA K. (1992). Molecular cloning of a mouse 47 kDa heat - shock protein (HsP47), a collagen binding stress protein and its expression during the differentiation of F9 teratocarcinoma cells. *Eur. J. Biochem.*, **206**, 323-329.

TAKANO T ; BLACK WJ ; PETER T.J and DE DUVE C. (1974). Assay, kinetics and lysosomal localization of au acid cholesteryl esterase in rabbit aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, **249**, 6732-6737.

TALL AR. (1998). An overview of reverse cholesterol transport. *Eur. Heart J.*, **19**, A31- A35.

TANIGUCHI N ; KANETO H ; ASAHI M ; TAKAHASHI M ; WENYI C ; HIGASHIYAMA S ; FUJII J ; SUZUKI K and KAYANOKI Y. (1996). Involvea of glycation and oxidative stress in diabetic macroangiopathy. *Diabetes.*, **45**, 581-583.

TARZIO JF ; WIGNESS B ; RHODE TD ; RUPP WM ; BUCHWAL DH and FURCHT LT. (1987). Non enzymatic glycation. Implication for diabetes mellitus. *Diabetes.*, **37**, 532-539.

TEDGUI A and MALLAT Z. (2000). Athérosclérose : inflammation et désinflammation. *S. T. V.*, **4**, 199-201.

TERTOV VV ; SOBENIN IA ; GABBASOV ZA ; POPOV EG ; JOAKKOLA O ; SOLAKIVI T ; NIKKARI T ; SMIRNOV VN and OREKHOV AN. (1992). Multiple-modified desialylated low density lipopropteins that cause intracellular lipid accumulation : Isolation, fractionnation and characterization. *Lab. Invest.*, **67**, 665-675.

THERET N ; DELBART C ; AGUIE G ; FRUCHART JC ; VASSAUX G ; and AILHAUD G. (1990). Cholesterol efflux from adipose cellls is coupled to diaglycerol production and proteine kinase C activation . *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **173**, 1361-1368.

THOMAS D ; RICHARD JL ; and ENNERICH J. (1992). La regression de l'athérosclérose est-elle possible ? *Arch. Mal. Cœur.* , **85**, 47-58.

THYBERG J ; HEDIN U ; SJOLUND M ; BOTTGER A and PALMERG L. (1990) Regulation of differential properties and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Atheroscl.*, **10**, 966-990.

THYBERG J ; NILSSON J ; PALMBERG L and SJÖLUND M. (1995). Adult human arterial smooth muscle cells in primary culture. Modulation from contractite to synthetic phenotype. *Cell. Tissue. Res.*, **239**, 69-74.

TORZEWSKI J ; BOWYER DE ; WALTEN BERGER J and FITZSIMMONS C. (1997). Processes in atherogenesis : complement activation. *Atheroscl.*, **132**, 131-138.

TOWBIN H ; STAHELIN T and GORDON J. (1979). Electrophoretic transfert of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets ; procedure and some explications. *Biochem.* **76**, 4350-4354.

TRELSTAD RL. (1984). The role of extracellular matrix in developement. *Alan. Liss. Inc. New York.* , 643. In *Collagènes et laminines : quels messages pour quelles cellules* ? (1998). Rousselle P ; Garrone R. *Path. Biol.*, **46**, 543-554.

TSIMIKAS S and REAVEN PD. (1998). The role of dietary fatty acids in lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.*, **9**, 301-307.

TULENKO TN ; CHEN M ; MASON PE and MASON RP. (1998). Physical effects of cholesterol on arterial smooth membranes : evidence of immiscible cholesterol domains and alterations in bilayer width during atherosclerosis. *J. Lipid. Res.*, **39**, 947-956.

TURK E ; MARTIN MG and WRIGHT EM. Structure of the human Na^+ / glucose co-transporter. *J. Biol. Chem.*, **269**, 15204-15209.

TURPIN G. (1989). Pourquoi, quand, comment traiter les hyperlipoprotéinémies. 3ème édition.

TURPIN G. (1997). L'hypercholestérolémie et le clinicien. *Med. Sci.* , **13**, 1393-1395.

TYAGI SC ; MEYER L ; SCHMALTZ RA ; REDDY HK and VOLKER DJ. (1995). Proteinases and restenosis in the human coronary artery : extracellular matrix production exceeds the expression of proteolytic activity. *Atherosclerosis.*, **116**, 43-57.

U

UITTO J. (1989). Molecular pathology of collagen. In : *Cutaneous developement*, *aging and repair*. Abatangelo G ; Davidson JM. Fidia. Research. Series., Vol 18.

V

VAN DER WERRE G and JEANRENAUD B. (1987). Liver Glycogen metabolism : an overview. *Diabet. Metab. Rev.*, **3**, 47-78.

VAN LEUWEN RTJ. (1996). Extracellular proteolysis and the migrating vascular smooth muscle cell . *Fibrinolysis.*, **10**, 59-64.

VAN DER GEER P ; HUNTER T and LINDBERG R. (1994). Receptor protein - tyrosine kinases and their signal transducction pathways. *Ann. bRev. Cell Biol.*, **10**, 251-337.

VAN DER HOCK YY ; SANGRAR W ; COTE GP ; KASTELEIN JJ and KOSCHINSKY ML. (1994). Binding of recombinant apolipoprotein (a) to extracellular matrix proteins. *Arterioscler. Thromb.* **14**, 1792-1798.

VAN DER REST M and GARRONE R. (1991). Collagen family of proteins. *Faseb. J.*, **5**, 2814-2823.

VAN DER WAL AC ; BECKER AE ; VAN DER LOOS CM ; TIGGES AJ and DAS P K. (1994a). Fibrous and lipid - rich atherosclerotic plaques are part of interchangeable morphologies related to inflammation : a concept. *Coron. Artery. Dis.*, **5**, 463-469.

VAN DER WAL AC ; BECKER EC ; VAN DER LOS DS and DAS PK. (1994b). Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an imflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation.*, **89**, 36-44.

VARRET M ; RABES JP and BOILEAU C. (1997). L'hypercholestérolémie familiale 25 ans après. I. Défauts du récepteur des LDL. *Med. Sci.*, **13**, 1399-1408.

VAULMONT S ; MUNNICH A ; DECAUX JF and KAHN A. (1986). Transcriptional and post-transcriptional regulation of L-type pyruvate kinase gene expression in rat liver . *J. Biol. Chem.*, **261**, 7621-7625.

VAUNGHAN L ; FISCHER RW ; ZIMMERMANN DR and WINTERHALTER KH. (1984). Nonenzymatic glycosylation of proteins. A new and rapid solution for *in vitro* investigation. *FEBS Letters.*, **173**, 173-178.

VEIS A and PAYNE K. (1988). Collagen fibrillogenesis. In : *Collagen Biochemistry*. Nimni ME (eds). 113-137.

VILLASCHI S ; NICOSIA RF and SMITH MR. (1994). Isolation of a morphologically and functionally distinct smooth muscle cell type from the intimal aspect of the normal rat aorta. Evidence for smooth muscle cell heterogeneity. *In vitro Cel. Dev. Biol. Anim.,* **30A**, 589-595.

VINTERS HV ; BERLINER JA ; BECK DW ; MAXWEL K ; BREADY JV and CANCILLA PA. (1985). Insulin stimulates DNA synthesis in cerebral microvessel endothelium and smooth muscle. *Diabetes*., **34**, 964-969.

VINTERS HV and BERLINER JA. (1987). The blood vessl wall as an insulin target tissue. Insuline et paroi vasculaire. *Diab. Métab*., **13**, 294-300.

VIOLARIS AG De Jong M ; MC LEOD DC ; UMANS VA ; VERDOW PD and SERRUYS PW. (1996). Increased extracellular matrix synthesis by smooth muscle cells from *in vivo* restenotic lesions by directional atherectomy . *Am. Hearth. J*., **131**, 613-615.

VOGEL RA. (1997). Coronary risk factor, endothelial function, and atherosclerosis : a review. *Clin. Cardiol*., **20**, 426-432.

W

WANG S ; DESAI P ; WRIGHT G ; NILES RM and WRIGHT GL. (1997). Effects of protein kinase C alpha overexpression on A7r5 smooth muscle cells proliferation and differentiation. *Exp. Cell. Res*., **236**, 117-126.

WEBER C ; ERL W ; WEBER KSC and WEBER PC. (1997). HMG CoA reductase inhibitors decrease CD 11b expression and CD 11b-dependant adhesion of monocytes to endothelium and reduce adhesivens of monocytes isolated from patients hypercholesterolemia. *J. Am. Coll. Cardiol*., **30**, 1212-1217.

WEISS SB and AYAD S. (1982). An introduction to collagen. In : *Collagen in health and disease*. Weiss JB and Jason MIV. (Eds). Edimbourg. Churchill Livingstone. 1-27.

WEISSBERG PL ; CLESHAM GJ and BENNETT MR. (1996). Is vascular smooth muscle cells proliferation benefical ? *Lancet*., **347**, 305-307.

WEST K. (1978). Epidemiology of diabetic and its vascular lesions. Elsevier. Shanon.

WEST KM. (1982). Hyperglycaemia as a cause of long term complication, in complication of diabetes. Edited by Keen H ; Jarret R. London Arnold., **13**.

WIESTNER M ; ROHDE H ; HELLE O ; KRIEF T ; TIMPl R and MULLER PK. (1982). Low rate of procollagen conversion in dermatosparatic sheep fibroblasts is parallel by increased synthesis of type I and type III collagen. *Embo. J*., **1**, 513–516.

WIGHT TN ; KINSELLA W G and POTTER PERIGO S. (1985). Proteoglycans synthetized and secreted by cultured smooth muscle cells . In : *Extracellular matrix : structure and function*. AH Redd New-york Alan liss Inc.

WIGHT TN. (1996). Arterial wall. In : "*Extracellular matrix*." Vol 1, 178-202. Eds. Hardood. Academic. Publishers.

WINEGRAD AI. (1987). Banding lecture 1986. Does a common mechanisms induce the diverse complications of diabetes. *Diabetes*., **36**, 396.

WITZIUM JL ; FISHER M ; PIETROT R ; STEIN BRECHER UP and ELAM RL. (1982). Non enzymatic glycosylation of higt density lipopratrein. Acceletates its catabolism in guinea pigs. *Diabetes*. , **31**, 1029-1032.

WITZIUM JL. (1994). The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet*., **344**, 793-795.

WOLINSKY H ; GOLDFISCHER S ; SCHILLER B and KASAK LE. (1973). Lysosomes in aortic smooth muscle cells : Effects of hypertension. *Am. J. Pathol.*, **73**, 727-734.

WOOL IG ; WETTENHALL EH ; BREMBARHK and ABAYAG N. (1972). Insulin and the control of protein synthesis in muscle. In : *Insulin action*. Fritz IB. Acad. Press. New York and London.

Y

YAMAMOTO M ; YAMAMOTO K and NOUMURA R. (1993). Type I collagen promotes modulation of cultured rabbit arterial smooth muscle cells from a contractile to a synthetic phenotype. *Exp. Cell. Res.*, **204**, 121-129.

YAN WD ; PERK M ; CHAGPAR A ; WEN Y ; SHATOFF S ; SCHNEIDER WJ ; JUDUTT BI ; TULIP J and LUCAS A. (1995). Laser – induced fluorescence : III quantitative analysis of atherosclerotic plaque content. *Laser. Surg. Med.*, **16**, 164-178.

YIPP CC. (1992). The insulin binding domain of the insulin receptor is encoded by exon 2 and 3. *J. Cell. Biochem.*, **48**, 19-25.

YLÄ HERTUALA S ; PALINSKY W ; BUTLER SW ; PICARD S ; STEINBERG D and WITZIUM JL. (1994). Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL. *Atheroscler. Throm.*, **14**, 32-40.

YLÄ HERTUALLA S. (1992). Gene expression in atherosclerotic lesions. *Herz.*, **17**, 270-276.

Z

ZELMAT A. (1990). Effets de la thérapeutique aux biguanides antidiabétiques sur les troubles lipidiques et les complications vasculaires chez le rat des sables (P.o) rendu diabétique par un régime athérogène. Thèse Magister, USTHB, Alger.

ZICK Y. (1989). The insulin receptor : structure and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol.Biol.*, **24**, 217-269.

ZOCK PL and KATAN MP. (1998). Diet, LDL oxidation and coronary artery disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, **68**, 759-760.

ANNEXES

TABLEAU IV

Estimation des aires de prolifération et des accroissements relatifs obtenus à partir d'explants d'aortesde R.n et P.o en culture primaire

	Aires de prolifération (mm^2)		Accroissement relatif	
Semaines	Rn	Po	Rn	Po
S_2	106 ± 31	123 ± 37		
S_3	201 ± 45	264 ± 48	0,96 ± 0,25	1,17 ± 0,22
S_4	365 ± 24	429 ± 28	0,8 ± 0,19	1,05 ± 0,19
S_5	472 ± 50	505 ± 43	0,28 ± 0,1	0,21 ± 0,07
S_6	480 ± 40	512 ± 52	0,07 ± 0,01	0,02 ± 0,001

TABLEAU X

REPARTITION DES PROTEINES TOTALES DANS LES CML DE R.n ET DE P.o EN CULTURE DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES (µg/10^6 cellules)

	Etat	CML de R.n	CML de P.o
Normal (N)	C	310 ± 29	295 ± 18 $^{+}$
	S	797 ± 39	1111 ± 45 $^{+++}$
N+G 48h	C	475 ± 13 °°°	557 ± 33 °°° $^{++}$
	S	960 ± 57 ***	1211 ± 36 ** $^{+++}$
N+G 4P	C	1083 ± 55 °°°°	1258 ± 42 °°°° $^{++}$
	S	1805 ± 63 ****	2316 ± 35 **** $^{++++}$
Diab	C	2575 ± 99 °°°°	3018 ± 204 °°° $^{++}$
	S	3968 ± 253 ****	4603 ± 254 *** $^{++}$
N+G 4P+Ins	S	1457 ± 134 ¤¤¤¤ xxxx	1763 ± 122 ¤¤¤¤ $^{++}$
Diab+Ins	S	1645 ± 123 ¤¤¤¤ xxxx	1623 ± 94 ¤¤¤¤ xxxx

TABLEAU XI

REPARTITION DES COLLAGENES TOTAUX CONTENUS DANS LES CML DE R.n ET P.o EN CULTURE, DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES (µg/10^6 cellules)

	Etat	R.n	P.o
Normal (N)	C	66 + 10	54 + 2 $^{++}$
	S	217 + 16	347 + 53 $^{+}$
N+G 48h	C	135 + 2 °°°	168 + 34 °°°° $^{+}$
	S	458 + 18 ****	709 + 40 **** $^{+++}$
N+G 4P	C	572 + 30 °°°°	746 + 48 °°°° $^{++}$
	S	1323 + 31 ****	1880 + 166 **** $^{++++}$
Diabétique	C	2100 + 136 °°°°	2617 + 198 °°°° $^{+++}$
	S	3110 + 310 ****	3632 + 284 **** $^{+}$
N+G 4P+Ins	S	685 + 92 ¤¤¤¤ xxxx	1250 + 194 ¤¤¤¤ xxxx +++
Diab+Ins	S	667 + 60 ¤¤¤¤ xxxx	1432 + 105 ¤¤¤¤ xxxx ++++

Les valeurs sont les moyennes de six détermination ± l'écart type de 6 déterminations

(°) Etat C de Diab vs état C ± G 4P vs état C ± G 48h vs état basal C

(*) Etat S de Diab vs état S ± G 4P vs état S ± G 48h vs état basal S

(¤) influence de l'insuline vs témoins correspondants

(x) influence de l'insuline vs état synthétique basal

TABLEAU XIV

BIOSYNTHESE DES COLLAGENES TOTAUX PAR LES CML DE R.n ET P.o EN CULTURE, DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES

	Etat	Synthèse Globale (cpm/10^6 cellules) CML de R.n		CML de P.o
N	C	220 ± 25		209 ± 7
	S	657 ± 76		1031 ± 69
N+G48h	C	461 ± 42	°°°°	544 ± 36 °°°°
	S	983 ± 97	***	1298 ± 65 ****
N+G4P	C	1042 ± 100	°°°°	1792 ± 164 °°°°
	S	2274 ± 259	****	3279 ± 222 ****
Diab	C	3963 ± 309	°°°°	5072 ± 271 °°°°
	S	5364 ± 4403	****	6952 ± 184 ****
N+G4P+Ins	S	1294 ± 163	¤¤¤ xxx	2028 ± 134 ¤¤¤ xxxx
Diab+Ins	S	1943 ± 120	¤¤¤¤ xxx	2374 ± 120 ¤¤¤¤ xxxx

La synthèse globale du collagène exprimée en cpm/10^o cellulesest estimée par la radioactivité contenue dans les deux compartiments (CEC et CIC)
Les valeurs sont représentées par les moyennes de six déterminations ± l'écart type
(°) Etat C de Diab ***vs*** état C + G 4P ***vs*** état C + G 48h ***vs*** état basal C
(*) Etat S de Diab ***vs*** état S + G 4P ***vs*** état S + G 48h ***vs*** état basal S
(¤) influence de l'insuline ***vs*** témoins correspondants
(x) influence de l'insuline ***vs*** état synthétique basal

TABLEAU XXI

TAUX DES COLLAGENES I et III (%) CONTENUS DANS LES CEC ET CIC DES CML DE R.n EN CULTURE, DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES

CEC	Etat	Collagène I	Collagène III
N	C	8,7 ± 0,6	6,2 ± 0,6 ****
	S	33,7 ± 3,2	18,2 ± 0,7 ****
N+G48h	C	28,6 ± 0,8	23,1 ± 0,2 **
	S	30,1 ± 2,5	28,8 ± 1,8 *
N+G4P	C	38,4 ± 1,1	27,3 ± 0,7 **
	S	72,7 ± 6,4	44,3 ± 3,3 ****
Diab	C	56,5 ± 5,0	35,7 ± 0,8 ****
	S	116,4 ± 6,2	72,8 ± 3,3 ****
N+G4P+Ins	S	47,4 ± 1,9	38,1 ± 1,2 **
Diab+Ins	S	55,1 ± 3,4	48,1 ± 2,4 **

CIC	Etat	Collagène I	Collagène III
N	C	4,9 ± 0,6	2,8 ± 0,2 ***
	S	11,9 ± 1,7	8,0 ± 1,1 ****
N+G48h	C	27,5 ± 0,2	19,7 ± 1,1 ****
	S	42,6 ± 5,2	38,0 ± 5,4
N+G4P	C	36,6 ± 0,9	29,2 ± 0,7 ****
	S	58,3 ± 7,9	43,8 ± 4,4 **
Diab	C	51,1 ± 3,3	32,5 ± 3,3 ****
	S	84,6 ± 6,7	62,4 ± 9,1 ***
N+G4P+Ins	S	53,0 ± 6,0	44,6 ± 3,3 **
Diab+Ins	S	67,4 ± 1,2	42,0 ± 4,2 ***

Les CML sont marquées avec ^{3}H Pro et le collagène pepsino-résistant des compartiments extra- et intracellulaires
marqué est séparé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10 % de SDS.
Les taux de collagène I et III totaux déterminés par intégration numériquesont
Les valeurs sont les moyennes de six déterminations ± l'écart type.
(*) Collagène I ***vs*** Collagène III

TABLEAU XXII

TAUX DES COLLAGENES I et III (%)

CONTENUS DANS LES CEC ET CIC DES CML DE P.o EN CULTURE, DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES

CEC

	Etat	Collagène I	Collagène III
N	C	11,0 ± 0,7	7,3 ± 0,5 ***
	S	43,2 ±1,9	26,6 ± 1,8 ****
N+G48h	C	35,7 ± 2,2	26,5 ± 0,3 **
	S	61,9 ± 4,4	35,0 ± 1,8 ****
N+G4P	C	53,6 ± 2,9	45,0 ± 2,9 **
	S	84,2 ± 4,2	54,5 ± 4,0 ****
Diab	C	89,8 ± 3,7	62,5 ± 3,7 ***
	S	140,3 ± 9,6	84,0 ± 3,7 ****
N+G4P+Ins	S	52,0 ± 2,0	43,1 ± 1,5 **
Diab+Ins	S	69,9 ± 2,6	61,2 ± 2,3 *

CIC

	Etat	Collagène I	Collagène III
N	C	2,7 ± 0,1	1,4 ± 0,1 ****
	S	13,3 ± 1,2	9,0 ± 0,8 ***
N+G48h	C	30,7 ± 0,9	28,7 ± 3,0
	S	78,2 ± 6,1	42,3 ± 4,4 ****
N+G4P	C	62,8 ± 5,1	43,9 ± 5,2 ****
	S	83,3 ± 9,4	60,6 ± 3,8 ***
Diab	C	89,8 ± 3,0	64,2 ± 2,4 ****
	S	150,4 ± 5,1	83,5 ± 2,4 ****
N+G4P+Ins	S	74,1 ± 5,4	60,1 ± 3,1 **
Diab+Ins	S	65,4 ± 8,6	49,3 ± 7,4 **

Les CML sont marquées avec ^{3}H Pro et le collagène pepsino-résistant des compartiments extra- et intracellulaires
marqué est séparé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10 % de SDS.
Les taux de collagène I et III totaux déterminés par intégration numériquesont
Les valeurs sont les moyennes de six déterminations ± l'écart type.
(*) Collagène I ***vs*** Collagène III

INDEX

INDEX DES TABLEAUX

TABLEAU I DIFFERENTS TYPES DE COLLAGENE **17**

TABLEAU II EVOLUTION DU SYNDROME DIABETIQUE CHEZ LE RAT DES SABLES P.o RENDU DIABETIQUE NON INSULINO DEPENDANT PAR UN REGIME HYPERCALORIQUE. **45**

TABLEAU III EVOLUTION DU SYNDROME DIABETIQUE CHEZ LE RAT DE LABORATOIRE R.n RENDU DIABETIQUE INSULINO DEPENDANT PAR UNE INJECTION DE STREPTOZOTOCINE. **47**

TABLEAU IV ESTIMATION DES AIRES DE PROLIFERATION ET DES ACCROISSEMENTS RELATIFS OBTENUS A PARTIR D'EXPLANTS D'AORTES DE R.n ET P.o EN CULTURE PRIMAIRE. **Annexe**

TABLEAU V ANALYSE MORPHOMETRIQUE DES LONGUEURS CELLULAIRES MAXIMALES DES CML DE R.n ET P.o EN CULTURE SECONDAIRE DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES. **78**

TABLEAU VI ANALYSE MORPHOMETRIQUE DES LONGUEURS NUCLEAIRES MAXIMALES DES CML DE R.n ET P.o EN CULTURE SECONDAIRE DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES. **81**

TABLEAU VII EVALUATION DU NOMBRE DE NUCLEOLES CONTENUS DANS LES CML DE R.n ET P.o EN CULTURE SECONDAIRE DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES. **84**

TABLEAU VIII BIOSYNTHESE DES PROTEINES TOTALES (cpm/10^6 cellules) PAR LES CML DE R.n ET P.o EN CULTURE SECONDAIRE, DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES. **88**

TABLEAU IX SECRETION DES PROTEINES TOTALES (%) PAR LES CML DE R.n ET P.o EN CULTURE SECONDAIRE, DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES. **90**

TABLEAU X REPARTITION DES PROTEINES TOTALES DANS LES CML DE R.n ET P.o EN CULTURE SECONDAIRE DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES. **Annexe**

TABLEAU XI REPARTITION DES COLLAGENES TOTAUX DANS LES CML DE R.n ET P.o EN CULTURE SECONDAIRE DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES. **Annexe**

TABLEAU XII INCORPORATION DE LA PROLINE TRITIEE (^{3}H PRO) DANS LES COLLAGENES TOTAUX CONTENUS DANS LES CEC ET CIC DES CML DE R.n ET P.o EN CULTURE, DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES. **99**

TABLEAU XIII TAUX DE SYNTHESE ET DE SECRETION DES COLLAGENES TOTAUX (%) PAR LES CML DE R.n ET P.o EN CULTURE, DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES. **101**

TABLEAU XIV BIOSYNTHESE DES COLLAGENES TOTAUX (cpm/10^6 cellules) PAR LES CML DE R.n ET P.o EN CULTURE SECONDAIRE, DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES. **Annexe**

TABLEAU XV EVALUATION DES TAUX DES CHAÎNES α1 (I+III) ET α2 (I) CONTENUES DANS LES CEC ET CIC DES CML DE R.n ET P.o EN CULTURE, DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES. **113**

TABLEAU XVI EVALUATION DU RAPPORT α1/α2 DANS LES DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES. **115**

TABLEAU XVII INCORPORATION DE ^{3}H PRO DANS LES COLLAGENES I ET III DES CEC DES CML DE R.n ET P.o EN CULTURE DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES. **124**

TABLEAU XVIII BIOSYNTHESE DES COLLAGENES I ET III (cpm/10^6 cellules) PAR LES CML DE R.n ET P.o EN CULTURE SECONDAIRE, DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES. **124**

TABLEAU XIX TAUX DE SYNTHESE DES COLLAGENES I ET III (%) PAR LES CML DE R.n ET P.o EN CULTURE, DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES. **126**

TABLEAU XX TAUX DE SECRETION DES COLLAGENES I ET III (%) PAR LES CML DE R.n ET P.o EN CULTURE, DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES. **126**

TABLEAU XXI ESTIMATION DES TAUX DES COLLAGENES I ET III (%) CONTENUS DANS LES CEC ET CIC DES CML DE R.n EN CULTURE, DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES. **Annexe**

TABLEAU XXII ESTIMATION DES TAUX DES COLLAGENES I ET III (%) CONTENUS DANS LES CEC ET CIC DES CML DE P.o EN CULTURE, DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES. **Annexe**

TABLEAU XXIII EVALUATION DES FRACTIONS DE CHOLESTEROL LIBRE (CL), ESTERIFIE (CE), TOTAL (CT) CONTENUS DANS LES CML DE R.n ET P.o, DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES. **142**

INDEX FIGURES

Figure 1 - Différents stades de l'évolution de la plaque d'athérosclérose. **14**

Figure 2 - Structure moléculaire du procollagène I précurseur du tropocollagène. **19**

Figure 3 - Transcription et maturation du préRNA en mRNA après épissage des introns. **20**

Figure 4 - Traduction, hydroxylation et glycosylation du collagène. **21**

Figure 5 - Conversion du procollagène en tropocollagène par clivage des extrémités N et C terminales. **23**

Figure 6 - Assemblage filamenteux des tropocollagènes. **24**

Figure 7 - Réactions chimiques conduisant à la glycation d'une protéine. **26**

Figure 8 - Schéma reproduisant la glycosylation non enzymatique des chaînes a des collagènes. **27**

Figure 9 - Représentation schématique d'une intégrine. **27**

Figure 10 - Représentation des différents domaines (I, II, III, IV) des subunités a et b d'une intégrine.

Figure 11 - Interaction cellule - matrice dans le programme de synthèse de la MEC. **28**

Figure 12 - Représentation des différentes particules lipoprotéiques et leurs sites récepteurs spécifiques. Voies exogène et endogène du cholestérol montrant l'intervention des différentes particules lipoproteiques. **30**

Figure 13 - Métabolisme des particules LDL. **31**

Figure 14 - Expression tissulaire et cellulaire du récepteur des HDL: SR-BI (scavenger receptor class B type I). **32**

Figure 15 - Représentation schématique du SR-BI chez le Hamster. **32**

Figure 16 - Internalisation des LDL dans la CML aortique. **33**

Figure 17 - Schéma du récepteur des LDL avec ses cinq domaines. **34**

Figure 18 - Synthèse, transport, fixation membranaire et recyclage du récepteur à LDL après son passage dans le Golgi. **35**

Figure 19 - Correspondance entre les domaines protéiques et les exons du gène LDLR. **35**

Figure 20 - Voies enzymatiques de régulation du cholestérol. **37**

Figure 21 - Oxydation progressive des LDL au contact des CML, des macrophages et des cellules endothéliales dans la sous intima. **38**

Figure 22 - Captation des LDL oxydées par les macrophages et les CML. **39**

Figure 23 - Conversion des CML et des macrophages en cellules spumeuses. **40**

Figure 24 - Evolution du syndrome diabétique chez le rat des sables soumis à un régime hypercalorique. **46**

Figure 25 - Mise en culture par la méthode d'explantation. **48**

Figure 26 - Mise en culture des CML. **51**

Figure 27 - Protocole de l'étude morphométrique **53**

Figure 28- Protocole d'étude de l'activité cholestérogénique. **55**

Figure 29 - Protocole de la biosynthèse des collagènes. **60**

Figure 30 - Séparation des différentes chaînes α des collagènes I et III. **61**

Figure 31 - Zone d'équivalence indiquée par la Courbe de Heidelberger. **62**

Figure 32 - Détermination de la zone d'équivalence par précipitation en milieu liquide (ring test) pour les anticorps anti collagène I et anti collagène III **63**

Figure 33 - Diagramme représentant le transfert des chaînes α. **64 Bis**

Figure 34 - Témoin de transfert. **65**

Figure 35 - Protocole d'étude du procédé d'immunologie. **66**

Figure 36 - Visualisation de l'anticorps anti a2 par absorbance. **67**

Figure 37 - Protocole d'étude de l'influence de l'insuline. **68**

Figure 38 - Estimation des aires de prolifération à partir d'explants d'aorte de CML de R.n et P.o en culture primaire. **72**

Figure 39 - Détermination de l'accroissement relatif des CML d'aortes de R.n et P.o en culture primaire. **74**

Figure 40 - Longueurs cellulaires maximales des CML d'aortes de R.n et P.o en culture secondaire dans différentes conditions expérimentales, aux phénotypique contractile et synthétique. **80**

Figure 41 - Longueur nucléaires maximales des CML de R.n et P.o en culture secondaire dans différentes conditions expérimentales, aux phénotypes. **83**

Figure 42 - Estimation du nombre de nucléoles dans les CML de R.n et P.o en culture secondaire dans différentes conditions expérimentales aux phénotypes C et S. **85**

Figure 43 - Incorporation de 3H Pro dans les protéines totales des CML de R.n et P.o en culture secondaire à leur état basal contractile (C) et synthétique (S). **91**

Figure 44 - Effet du glucose à concentrations élevées (15mM) pendant 48h sur l'incorporation de 3H Pro dans les protéines totales des CML de R.n et P.o en culture secondaire aux phénotypes C et S. **92**

Figure 45 - Effets de concentrations élevées de glucose (15mM) durant 4 passages sur l'incorporation de ^{3}H Pro dans les protéines totales des CML de P.o et R.n en culture secondaire aux phénotypes C et S. **93**

Figure 46 - Incorporation de ^{3}H Pro dans les protéines totales des CML en culture secondaire de R.n et P.o diabétiques, aux phénotypes C et S. **94**

Figure 47 - Influence de l'insuline à 4 mU/ml pendant 48h sur la biosynthèse des protéines totales dans les CML. **95**

Figure 48 - Influence de l'insuline à 4 mU/Ml pendant 48h sur la biosynthèse des protéines totales dans les CML de P.o en culture secondaire incubées durant 4P dans du glucose et celles provenant de P.o diabétique, au phénotype S. **95**

Figures 49 - Sécrétion des protéines par les CML de R.n et P;o en culture secondaire au phénotypes C et S dans les différentes conditions expérimentales étudiées. **96**

Figure 50 - Incorporation de ^{3}H Pro dans les protéines totales du CEC des CML de R.n et P.o en culture secondaire aux phénotypes C et S dans les différentes conditions expérimentales étudiées. **97**

Figure 51 - Incorporation de ^{3}H Pro dans les protéines totales du CIC des CML de R.n et P.o en culture secondaire dans différentes conditions expérimentales étudiées aux phénotypes C et S. **97**

Figure 52 - Biosynthèse globale des protéines totales correspondant à l'incorporation de ^{3}H Pro dans les deux compartiments (Milieu et cellules) des CML de R.n et P.o en culture secondaire dans différentes conditions expérimentales étudiées. **98**

Figures 53 - Biosynthèse et répartition des collagènes totaux dans les CML aortiques de R.N et P.o en culture secondaire aux phénotypes C et S de l'état basal. **100**

Figure 54 - Taux des collagènes totaux et taux de leur sécrétion dans les CML aortiques de R.n et P.o en culture secondaire aux phénotypes C et S de l'état basal. **102**

Figure 55 - Effet de concentrations élevées de glucose (15mM) pendant 48h sur la biosynthèse et la répartition des collagènes dans les CML aortiques de R.n et P.o en culture secondaire aux phénotypes C et S. **103**

Figure 56 - Effet du glucose à concentrations élevées (15mM) pendant 48h sur les taux de collagène et les taux de leur sécrétion dans les CML aortiques de R.n et P.o en culture secondaire aux phénotypes C et S. **103**

Figure 57 - Effet du glucose à concentrations élevées (15mM) durant 4P sur la biosynthèse et la répartition des collagènes dans les CML aortiques de R.n et P.o en culture secondaire aux phénotypes C et S. **104**

Figure 58 - Effet du glucose à concentration élevées (15mM) durant 4P sur les taux de collagène et les taux de leur sécrétion dans les CML aortiques de R.n et P.o en culture secondaire aux phénotypes C et S. **105**

Figure 59 - Incorporation de 3H Pro dans les collagènes et leur répartition dans les CML aortiques de R.n et P.o diabétiques en culture secondaire, aux phénotypes C et S. **106**

Figure 60 - Taux des collagènes et taux de leur sécrétion dans les CML aortiques de R.n et P.o diabétiques en culture secondaire aux phénotypes C et S. **106**

Figure 61 - Influence de l'insuline à 4 mU/ml pendant 48h sur la biosynthèse des collagènes dans CML aortiques de R.n en culture secondaire incubées durant 4P dans du glucose 15mM et celles provenant de R.n diabétique. **107**

Figure 62 - Influence de l'insuline à 4 mU/Ml pendant 48h sur la biosynthèse des collagènes dans CML aortiques de P.o en culture secondaire incubées durant 4P dans du glucose 15mM et celles provenant de P.o diabétique. **107**

Figure 63 - Influence de l'insuline à 4 mU/Ml pendant 48h sur les taux de collagène et les taux de sécrétion dans CML aortiques de R.n en culture secondaire incubées durant 4P dans du glucose et celles provenant de R.n diabétique, au phénotype S. **108**

Figure 64 - Influence de l'insuline à 4 mU/Ml pendant 48h sur les taux de collagène et les taux de sécrétion dans CML aortiques de P.o en culture secondaire incubées durant 4P dans du glucose et celles provenant de P.o diabétique, au phénotype S. **108**

Figure 65 - Taux de sécrétion des collagènes par les CML aortiques de R.n et P.o en culture secondaire dans les différentes conditions expérimentales étudiées aux phénotypes C et S. **109**

Figure 66 - Incorporation 3H Pro dans les collagènes du milieu (CEC) des CML aortiques de R.n et P.o en culture secondaire aux phénotypes C et S dans les différentes conditions expérimentales. **110**

Figure 67 - Incorporation 3H Pro dans les CML aortiques (CIC) de R.n et P.o en culture secondaire aux phénotypes C et S dans les différentes conditions expérimentales étudiées. **110**

Figure 68 - Taux des collagènes totaux dans les deux compartiments extra (CEC) et intracellulaire (CIC) des CML aortiques de R.n et P.o en culture secondaire dans les différentes conditions expérimentales étudiées aux phénotypes C et S. **111**

Figure 69 - Quantification des chaînes α1 et α2 des collagènes I et III à l'état basal contractile. **114**

Figure 70 a, b - Quantification des chaînes α1 et α2 des collagènes I et III à l'état basal synthétique. **114**

Figure 71 a, b - Effet du glucose à court terme sur la quantification des chaînes α1 et α2 des collagènes I et III. **116**

Figure 72 a, b - Effet du glucose à long terme et influence de l'insuline sur la quantification des chaînes α1 et α2 des collagènes I et III. **117**

Figure 73 a, b - Etats diabétiques et influence de l'insuline sur la quantification des chaînes α1 et α2 des collagènes I et III. **118**

Figure 74 - Mise en évidence, par électrosynérèse, de l'arc de précipitation correspondant à l'anticorps anti α1 spécifique aux chaînes α1 du collagène III, contenu dans l'immunsérum de bouc. **120**

Figure 75 - Mise en évidence, par électrosynérèse, des deux arcs de précipitation correspondant aux anticorps anti α1 et anti α2 spécifiques aux chaînes α1 et α2 du collagène I contenus dans l'immun sérum de lapin. **120**

Figure 76 - Immunoblotting des chaînes α1 (I) et α2 (I) contenues dans les CEC des CML de P.o dans les différentes conditions expérimentales étudiées. **121**

Figure 77 - Immunoblotting des chaînes α1 (I) et α2 (I) contenues dans les CML de P.o dans les différentes conditions expérimentales étudiées. **121**

Figure 78 - Immunoblotting des chaînes α2 (I) contenues dans le CEC des CML de P.o dans les différentes conditions expérimentales étudiées, après absorbance de l'anticorps anti collagène I. **122**

Figure 79 - Immunoblotting des chaînes α1 des collagènes III dans certaines conditions expérimentales. **122**

Figure 80 - taux totaux des collagènes I et III (contenus dans le milieu et les cellules) et taux de leur sécrétion par les CML aortiques de R.n et P.o en culture secondaire aux phénotypes C et S de l'état basal. **127**

Figure 81 - Incorporation de 3H Pro dans les collagénes I et III des CEC et CIC des CML aortiques de R.n en culture secondaire aux phénotypes C et S de l'état basal. **128**

Figure 82 - Effet du glucose à concentrations élevées (15mM) pendant 48h sur le taux des collagènes I et III et le taux de leur sécrétion par les CML aortique de R.n et P.o en culture secondaire aux états phénotypiques C et S. **130**

Figure 83 - Effet du glucose à concentrations élevées (15mM) pendant 48h sur l'incorporation de 3H Pro dans les collagènes I et III des CEC et CIC des CML aortiques de R.n et P.o en culture secondaire aux états phénotypiques C et S. **130**

Figure 84 - Effet du glucose à des concentrations élevées (15mM) durant 4P sur le taux des collagènes I et III et le taux de leur sécrétion par les CML aortiques de R.n et P.o en culture secondaire aux états phénotypiques C et S. **132**

Figure 85 - Effet du glucose à des concentrations élevées (15mM) durant 4P sur l'incorporation de 3H Pro dans les collagènes I et III des CEC et CIC des CML aortiques de R.n et P.o en culture secondaire aux états phénotypiques C et S. **132**

Figure 86 - Taux totaux des collagènes I et II et taux de leur sécrétion par les CML aortiques de R.N et P.o diabétique mise en culture secondaire aux phénotypes C et S. **134**

Figure 87 - Incorporation de 3H Pro dans les collagènes I et III des CEC et CIC des CML aortiques de R.n et P.o Diabétique en culture secondaire aux états phénotypiques C et S. **134**

Figure 88 - Influence de l'insuline à 4 mU/ml pendant 48h sur les taux des collagènes I et III et le taux de leur sécrétion par les CML aortiques de R.n en culture incubées durant 4P dans du glucose 15 mM et celles provenant de R.n diabétique au phénotype synthétique. **135**

Figure 89 - Influence de l'insuline à 4 mU/ml pendant 48h sur l'incorporation de 3H Pro dans les collagènes I et III des CEC et CIC des CML aortiques de R.n en culture incubées durant 4P dans du glucose 15 mM et celles provenant de R.n diabétique au phénotype synthétique. **136**

Figure 90 - Influence de l'insuline à 4 mU/ml pendant 48h sur les taux des collagènes I et III et le taux de leur sécrétion par les CML aortiques de P.o en culture incubées durant 4P dans du glucose 15 mM et celles provenant de P.o diabétique au phénotype synthétique. **136**

Figure 91 - Influence de l'insuline à 4 mU/ml pendant 48h sur l'incorporation de 3H Pro dans les collagènes I et III des CEC et CIC des CML aortiques de R.n en culture incubées durant 4P dans du glucose 15 mM et celles provenant de R.n diabétique au phénotype synthétique. **137**

Figure 92 - Taux de collagène I dans le compartiment extracellulaire des CML aortiques de R.n et P.o en culture secondaire dans les différentes conditions expérimentales étudiées aux phénotypes C et S. **138**

Figure 93 - Taux de collagène III dans le compartiment extracellulaire des CML aortiques de R.n et P.o en culture secondaire dans les différentes conditions expérimentales étudiées aux phénotypes C et S. **138**

Figure 94 -Taux de collagène I dans le compartiment intracellulaire des CML aortiques de R.n et P.o en culture secondaire dans les différentes conditions expérimentales étudiées aux phénotypes C et S. **139**

Figure 95 - Taux de collagène III dans le compartiment intracellulaire des CML aortiques de R.n et P.o en culture secondaire dans les différentes conditions expérimentales étudiées aux phénotypes C et S. **139**

Figure 96 - Taux de collagène I et III dans les CML aortiques de R.n dans les différentes conditions expérimentales étudiées aux phénotypes C et S. **140**

Figure 97 - Taux de collagène I et III dans les CML aortiques de P.o dans les différentes conditions expérimentales étudiées aux phénotypes C et S. **140**

Figure 98 - Evaluation des fractions de cholestérol libre estérifié et total dans les CML de R.n et P.o en culture secondaire aux états contractile et synthétique de l'état basal. **143**

Figure 99 - Evaluation des fractions CL, CE et CT dans les CML de R.n et P.o en culture secondaire aux phénotypes C et S après un incubation de 48h dans le milieu enrichi en glucose à 15 mM. **144**

Figure 100 - Evaluation des fractions de CL, CE et CT dans les CML de R.n et P.o en culture secondaire aux phénotypes C et S après une incubation de 4P dans un milieu enrichi en glucose à 15 mM. **145**

Figure 101 - Evaluation des fractions de cholestérol libre, total et estérifié dans les CML aortiques de R.n et P.o diabétiques en culture secondaire, aux phénotypes C et S. **146**

Figure 102 - Influence de l'insuline sur le cholestérol libre, estérifié et total contenu dans les CML de R.n en culture secondaire incubées dans du glucose 15 mM durant 4P et dans les CML de R.n diabétique, à l'état S. **147**

Figure 103 - Influence de l'insuline sur le cholestérol libre, estérifié et total déterminé dans les CML de P.o en culture secondaire incubées dans du glucose 15mM durant 4P et dans les CML de P.o diabétique, à l'état S. **147**

Figure 104 - Estimation du rapport CL/CE dans les différentes conditions expérimentales. **148**

Figure 105 - Evolution du CL dans les CML aortiques de R.n et P.o en culture secondaire dans toutes les conditions expérimentales étudiées. **149**

Figure 106 - Evolution du CE dans les CML aortiques de R.n et P.o en culture secondaire dans toutes les conditions expérimentales étudiées. **149**

INDEX PLANCHES

Planche I : Isolement de la média et confection des explants. **50**

Planche II : Evolution des CML en culture primaire **73**

Planche III : Evolution des CML en culture secondaire **76**

Planche IV : Effet du glucose à long terme et du diabète sur les CMLs de R.n et P.o en culture secondaire. Influence de l'insuline. **79**

Planche V : Effet du glucose à long terme et du diabète sue les CMLc de R.n et P.o. **79 Bis**