

République Algérienne Démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique
Université de Blida 1
Faculté des Sciences Agronomiques, Vétérinaires et Biologiques



MEMOIRE

Réalisé sous la direction du **Pr. S. ELAOUFI** et de **Mme F. BENZAOUZ**

Pour l'obtention du diplôme de
Master en Bio-signalisation Cellulaire et Moléculaire & Immunologie
Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Thème: Dysfonction des barrières hémato-rétiniennes dans la rétinopathie diabétique nutri-induite chez *Psammomys obesus*

Présenté et soutenu publiquement par

Amina SAFARZITOUNE

(Le 26 Décembre 2013)

Composition du Jury :

Président :	Mr BESAAD A.	Maître de conférences (B) à l'USDB
Rapporteurs :	Mme ELAOUFI S.	Maître de conférences (A) à l'USTHB
	Mme BENZAOUZ F.	Maître assistante à l'USDB
Examineurs :	Mme BRADAI M.S.	Maître de conférences (A) à l'USDB
	Mme KEBBAS S.	Maître assistante (A) à l'USDB

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement le Professeur AIT KACI pour m'avoir accueilli au sein de son service, pour sa gentillesse et son orientation dans le volet expérimental...

Je remercie aussi toutes les techniciennes du laboratoire d'anapath qui ont, avec leur patience et leur rigueur, contribués grandement à mon apprentissage et m'ont donnés le courage de continuer ce travail...

Je remercie ma promotrice Mme ALAOUFI pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et ma co-promotrice Mme BENAZOUZ pour son engagement continu tout au long de ce mémoire et de me faire profiter de leur expérience.

Je remercie également Mr BESAAD de me faire honneur de présider ce jury, ainsi que Mme BRADAI et Mme KEBBAS d'évaluer mon travail et d'y apporter leur savoir.

Un grand MERCI à mes parents et à ma sœur Amel, d'avoir crus en moi et de me soutenir dans les moments très difficiles que nous avons traversés

Merci aussi à ma grand-mère maternelle qui a toujours vu en moi de grandes qualités et qui me pousse à chaque fois à aller plus loin dans mes études ; un hommage à mon défunt grand-père, Sidou, j'espère que tu aurais été fier de ta petite fille...

Merci du fond du cœur à tous ceux qui ont contribués de près ou de loin à l'achèvement de ce travail

RÉSUMÉ

Notre étude a pour but de caractériser la réactivité des barrières hémato-rétiniennes, par l'expression de deux protéines majeures, le VEGF et la VE-cadhérine, suite à une glycosylation non-enzymatique; et à montrer leur importance dans la pathogenèse chez la gerbille *Psammomysobesus* résistante à l'insuline avec un surplus de poids après un régime hypercalorique. Pour cela la consommation quotidienne de nourriture, le gain de poids, la glycémie, la triglycéridémie, le cholestérol plasmatique et l'insulinémie ont été mesurés suivis d'une mise en évidence de l'expression du VEGF et de la VE-cadhérine par immuno-histochimie.

Nos résultats indiquent clairement la présence d'une dysfonction endothéliale, se manifestant par des dilatations et des occlusions des capillaires rétiniens, des ruptures des barrières hémato-rétiniennes internes et des déstabilisations des tissus sous-jacents par ouverture des jonctions inter-cellulaires où la VE-cadhérine est impliquée. Avec un contraste net entre l'expression du VEGF excessif et de la VE-cadhérine déficiente chez les modèles présentant la pathologie. Le VEGF joue un rôle essentiel dans la néovascularisation oculaire et dans l'hyperperméabilité observés au cours de l'évolution de la rétinopathie diabétique.

Mots-clés : Rétinopathie diabétique ; Bilan métabolique; Immuno-Histochimie ; VEGF ; VE-cadhérine.

ABSTRACT

Our study aims to characterize the ocular microvascular reactivity in hypoxic retina. Therefore, it is valuable to study the expression of two major proteins of endothelium, VEGF and VE-cadherin, in several well-characterized vascular beds, as the blood- retinal barriers, and to show their importance in diabetic pathogenesis in *Psammomys obesus*, an insulin resistant gerbil with overweight after a high-calorie diet. Therefore, daily food consumption, weight gain, blood glucose, triglycerides, cholesterol plasma and insulin were measured, followed by highlighting the expression of VEGF and VE- cadherin by immunohistochemistry.

Our results clearly indicate the presence of endothelial dysfunction, manifested by dilatation and occlusion of retinal capillaries ruptures of internal blood- retinal barrier and destabilization of the underlying tissues by opening intercellular junctions where VE – cadherin is involved. With a sharp contrast between the excessive expression of VEGF and deficient one of VE-cadherin in pathological models. VEGF plays a critical role in ocular neovascularization and hyperpermeability observed during the development of diabetic retinopathy.

Keywords: Diabetic retinopathy ; Metabolic balance ; Immuno - histochemistry ; VEGF ; VE- cadherin.

ملخص

تهدف دراستنا إلى توضيح تفاعلية الأوعية الدموية الدقيقة المكوّنة لحواجز الشبكية عن طريق التعرف عن اثنتين من البروتينات الرئيسية و هما: VEGF (عامل نمو بطانة الأوعية الدموية) و VE-cadhérine (كادرين الأوعية الدموية) بعد ارتباطهما بالجليكوزيل الغير أنزيمي و إظهار أهميتهما في الإعتلال السكري عند جرذ الرمال المقاومة للأنسولين مع زيادة في الوزن بعد تعرضها لنظام غذائي عالي السرعات الحرارية.

ولهذا الغرض تمّ قياس مختلف المعالم البلازمية كالسكر في الدم، الأنسولين، الكولسترول و ثلاثي الغليسريد مع إتباع الإستهلاك الغذائي اليومي و زيادة الوزن، بعد ذلك تمّ تعيين VEGF و VE-cadhérine عبر التّقنية المناعية.

نتائجنا تشير بوضوح إلى وجود إختلال وظيفي يتجلى في توسّع و إنسداد الشعيرات الدموية في شبكية العين و تمزّقات للحواجز الدموية الداخلية، زعزعة الإستقرار في الأنسجة المحيطة الناتجة عن فتح الوصلات بين الخلايا أين VE-cadhérine تلعب دور. نشاهد أيضا فرق واضح بين VEGF المعيّن بتعبير مفرط و نقص في VE-cadhérine عند النماذج التجريبية المختارة. نستنتج أنّ VEGF له دور هام في إتساع الأوعية الدموية و النفوذية المفرطة الملاحظة خلال الدراسة النسيجية.

كلمات البحث: اعتلال الشبكية السكري؛ التحليل الأيضي؛ التّقنية المناعية؛ VEGF؛ VE-cadhérine .

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	I
INDEX DES TABLEAUX ET FIGURES	II
INTRODUCTION	1
PARTIE A : APPROCHE THEORIQUE	4
CHAPITRE I : CONTEXTE DE NOTRE ETUDE	4
SECTION I : LA RETINOPATHIE DIABETIQUE	4
I.1. EPIDEMIOLOGIE DE LA RD	4
I.2. STADES D'EVOLUTION DE LA RD	4
I.2.1. Phase non-proliférative	5
I.2.2. Phase pré-proliférative	5
I.2.3. Phase proliférative	5
I.3. FACTEURS DE RISQUE	5
I.4. TRAITEMENTS	5
SECTION II : STRUCTURE ET PHYSIOLOGIE	6
DU SYSTEME VASCULAIRE	6
II.1. LE RESEAU VASCULAIRE	6
II.1.1. Structure des micro-vaisseaux	6
II.1.2. Les microvaisseaux au sein de l'œil	7
II.1.2.1. Anatomie du globe oculaire	7
II.1.2.2. La rétine	8
II.1.2.3. Vascularisation rétinienne	9
II.2. L'ENDOTHELIUM VASCULAIRE	10
II.2.1. La structure de l'endothélium	10
II.2.2. Les rôles de l'endothélium	10
II.2.3. Développement vasculaire	11
II.2.3.1. La vasculogenèse	11
II.2.3.2. L'angiogenèse	11
II.2.3.2.1. Définition et mécanisme	11
II.2.3.2.2. Le VEGF, principal facteur	
angiogénique	14
a-Généralités	14

b- Fonctions	14
II.3. LES JONCTIONS ENDOTHELIALES	14
II.3.1. Les complexus adhaerentes	16
II.3.2. Les jonctions communicantes	16
II.3.3. Les jonctions serrées (zonula occludens)	16
II.3.4. Les jonctions adhérentes	16
II.4. LA VE-CADHERINE, PRINCIPALE CADHERINE ENDOTHELIALE	17
II.4.1. Structure	17
II.4.2. Auto-assemblage	18
SECTION III : GLUCOTOXICITE ET DYSFONCTION VASCULAIRE DANS LA RD	19
III.1. ROLE DE L'HYPERGLYCEMIE	19
III.2. LES HYPOTHESES PATHOGENIQUES PROPOSEES	19
III.1.1. Hypothèse d'hémodynamique	19
III.1.2. Hypothèse biochimiques	20
a- Voie des polyols	20
b- Voie de la PKC	20
c- Voie des hexosamines	20
d- La glycosylation non-enzymatique	20
III.1.3. LA PLACE DES AGE DANS NOTRE ETUDE	21
III.1.4. LE STRESS OXYDANT	22
PARTIE B : APPROCHE EXPERIMENTALE	
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	
II.1. MATERIEL BIOLOGIQUE	23
II.1.1. Notre modèle expérimental et son régime alimentaire	23
II.1.1.1. <i>Psammomys obesus</i> et son biotope	23
II.1.1.2. Echophysiologie de l'animal	24
II.1.1.3. Métabolisme de l' animal et son importance dans notre étude	25
II.2. MISE EN ŒUVRE EXPERIMENTALE	26
II.2.1. Capture des animaux	26
II.2.2. Conditionnement de l'animal au laboratoire	27

II.2.3. Répartition des lots _____	27
II.2.4. Les régimes alimentaires _____	28
II.2.4.1. Les chénopodiacées _____	28
II.2.4.2. Composition des régimes alimentaires _____	28
II.3. LES EXPERIMENTATIONS IN VITRO _____	29
III.3.1. Techniques opératoires _____	30
II.3.1.1. Contrôle du poids corporel _____	30
III.3.1.2. Prélèvement des échantillons _____	30
II.3.2. Techniques analytiques _____	30
II.3.2.1. Dosages plasmatiques (Glucose, TG, cholestérol, insuline) _____	30
II.3.2.1.1. Principes des dosages _____	30
II.3.2.1.2. Modes opératoires _____	33
II.3.2.1.3. Méthodes de calcul _____	33
II.2.3. Etude statistique _____	34
II.2.4. La technique histologique _____	35
II.2.4.1. Préparation des coupes histologiques _____	35
II.2.4.1. Coloration à l'HE pour l'observation des structures _____	36
II.2.4.2. IHC VEGF et VE-cadhérine _____	37
CHAPITRE III : RESULTATS & DISCUSSION	
III.1. RESULTATS _____	40
III.1.1. Résultats métaboliques _____	40
III.1.1.1. Evolution du poids corporel des <i>psammomys</i> témoins et des <i>psammomys</i> soumis au RHC pendant 9 mois _____	40
III.1.1.2. Comparaison des paramètres biochimiques sériques entre les PO soumis au RN et les PO soumis au RHC _____	41
III.1.1.2.1. Glycémie _____	41
III.1.1.2.2. Triglycémie _____	41
III.1.1.2.3. Cholestérolémie _____	42
III.1.1.2.4. Insulinémie _____	43
III.1.2. Résultats de l'étude histologique _____	44
III.2. DISCUSSION _____	58

CONCLUSION & PERSPECTIVES _____ **62**

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXES

LISTE DES ABREVIATIONS

AGE : Advanced glycation end-products (Produits terminaux de la glycation avancée)

BHR : Barrière hémato-rétinienne

Csk : C-terminal Src kinase

DAG : Diacyl glycérol

ERO ou ROS : espèces réactives de l'oxygène

HEV : Haute veinule endothéliale (« High Endothelial Venule »)

HIF : Hypoxia Induced Factor

MEC : matrice extra-cellulaire

VE-cadhérine : Vascular Endothelial-cadherin (cadhérine endothéliale vasculaire), cadhérine 5 ou CD144

PDGF : Platelet Derived Growth Factor

PECAM : Platelet/endothelial cell adhesion molecule

PI3K : Phosphatidil inositol 3-kinase

PKC : Protein kinase C

PLA2 : Phospholipase A2

PLC : Phospholipase C

TNF α : Tumor Necrosis Factor

TG : Triglycérides

uPA : urokinase Plasminogen Activator

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VEGF-R : Récepteur au VEGF

ZO-1 : Zonula occludens

INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1. Les différents types de vaisseaux sanguins. D'après (Rakesh K Jain, Nature Medicine, 2003).....	7
Figure 2. Anatomie de l'œil humain (Bernard J.-A., Encyclopedia universalis, 2007 modifiée).....	8
Figure 3. Structure de la rétine (Renard et al., 1982).....	9
Figure 4. Produits d'expression et/ou de sécrétion des cellules endothéliales relatifs à la physiologie des vaisseaux. D'après (Sumpio et al., 2002).....	11
Figure 5. Vasculogenèse et étapes de l'angiogenèse, mécanismes régulateurs. Inspirée de (général (Li et coll.); étapes de l'angiogenèse (Carmeliet P)).....	13
Figure 6. Composition et organisation de la jonction adhérente inter-endothéliale traditionnellement décrite. D'après (Lampugnani et al., 1995; Navarro et al., 1995). La VE-cadhérine contracte par son extrémité extracellulaire des interactions homophiliques. Dans sa partie cytoplasmique, elle interagit directement soit avec la β -caténine (β), soit avec la γ -caténine (γ). Ces deux caténines, à leur tour, recrutent l' α -caténine (α). Cette dernière, par son domaine de liaison à l'actine, relie indirectement la VE-cadhérine au cytosquelette d'actine.....	15
Figure 7. Diagramme de l'organisation moléculaire des jonctions endothéliales et de leur entrelacement. D'après (Dejana, 2004).....	16
Figure 8. Organisation modulaire des cadhérines classiques. D'après (Nollet et al., 2000). Les cadhérines classiques, telles la VE-cadhérine, comprennent un domaine extracellulaire composé de cinq modules répétés (nommés EC1 à EC5). Les domaines EC1 à EC4 ont une structure similaire, tandis que le domaine EC5, le plus proche de la membrane, légèrement différent, comprend quatre résidus cystéyles à l'origine de deux ponts disulfures. Les cadhérines classiques possèdent un domaine transmembranaire (TM), et leur partie cytoplasmique présente deux domaines d'interaction conservés. Le domaine qui jouxte la membrane (JMD, JuxtaMembrane Domain) régit l'interaction avec les caténines p120 et p0071, et le domaine de liaison aux caténines (CBD, Catenin- Binding Domain) l'interaction avec la β - ou la γ -caténine.....	17

Figure 9. Structure moléculaire et mécanisme hypothétique d'adhérence des cadhérines
(Schéma récapitulatif d'après T.D. Pollard, W.C. Earnshaw, 2004)
cadhérines

Diagramme en ruban de la structure moléculaire d'un dimère des domaines CAD1 et CAD2 de la cadhérine E se jouxtant latéralement. Trois cations Ca (en bleu) stabilisent l'interaction intramoléculaire entre CAD1 et CAD2. **2.** Cinq domaines CAD empilés constituent le domaine extracellulaire en bâtonnet des cadhérines classiques. Ces domaines extracellulaires s'associent en dimères parallèles par interaction entre les domaines CAD1. **3.** Modélisation de la jonction de cellules adjacentes par les cadhérines reposant sur les interactions entre les domaines CAD1 dans des cristaux de cadhérine N.....18

Figure 10. La voie de la glycation non enzymatique et ses conséquences (Monnier VM, 2003).....21

INTRODUCTION

Aucune population n'échappe au diabète, maladie universellement répandue. Selon les projections de l'OMS, sa prévalence croîtra de 72% entre 2005 et 2030 (cf. annexe I).

En Algérie, la propagation du diabète ne cesse de prendre des proportions alarmantes et vient en deuxième position au classement des maladies chroniques après l'hypertension. En effet le nombre de personnes atteintes de diabète est de trois millions, soit un taux de 7,3% de la population globale (**Fédération Internationale du Diabète ; IDF, 2010**).

L'hyperglycémie chronique liée au diabète est associée à d'importantes séquelles dont la microangiopathie avec des complications dites « dégénératives » (**Racciah, 2004**). Plusieurs mécanismes étiopathogéniques impliqués dans leur développement via leurs effets sur le métabolisme cellulaires, la transduction du message et production de facteurs de croissance ont été évoqués (**Soro-Paavonen et Forbes, 2006**).

La rétinopathie diabétique (RD) classée parmi les microangiopathies est la cause principale de cécité chez l'adulte dans les pays développés (**Fong et al., 2004**). Elle se caractérise par une atteinte progressive structurale et fonctionnelle des microvaisseaux rétiniens (artérioles, veinules et capillaires). Les premières lésions histologiques de la RD sont l'épaississement de la membrane basale, la perte des péricytes (la paroi des capillaires) puis des cellules endothéliales des capillaires rétiniens aboutissant à leur obstruction (**Massin P., 2010**).

La transparence rétinienne est assurée par l'intégrité de la BHR, par le maintien d'un gradient de pression osmotique entre le milieu vitro-rétinien et la choroïde, et par l'épithélium pigmentaire qui assure une déshydratation active de la rétine (**Catier A. et al., 2005**). La rupture de cette barrière au cours du diabète, est caractérisée par le passage anormal de constituants plasmatiques dans la rétine et le vitré, qui se fait, soit entre les cellules endothéliales qui suppose l'ouverture des jonctions serrées, soit à travers la cellule endothéliale elle-même qui suppose une perméabilité accrue de la membrane plasmique, ou une augmentation du transport vésiculaire (**Antonetti D.A. et al., 1999**).

Cliniquement, les anomalies des BHR interne et externe sont particulièrement mises en évidence sous la forme de fuite de la fluorescéine injectée lors d'une angiographie humaine. Sur le plan histologique, l'observation de ces altérations étant impossible chez l'Homme, le recours à des modèles expérimentaux s'impose donc pour étudier le développement de la RD.

En menant notre étude, nous nous sommes posé les questions suivantes :

- L'hyperglycémie à long terme contribue-t-elle à l'apparition de la RD ?
- Les résultats anatomo-cliniques observés chez l'Homme concordent-ils avec les résultats histologiques obtenus au cours de notre étude sur *Psammomys obesus* notre modèle animal ?
- L'altération de la BHR a-t-elle une influence sur le bon fonctionnement de la neuro-rétine et les différents tissus qui l'entourent ?
- Existe-il une relation entre les altérations microvasculaires secondaires à un diabète de type 2 et l'expression de deux molécules clés qui sont le VEGF et la VE-cadhérine ?

Pour cela, nous avons utilisé un modèle animal expérimental de diabète de type 2 (DT2), *Psammomys obesus* ou rat des sables, que nous avons rendu diabétique en le soumettant à un régime hypercalorique (RHC) pendant une durée de 9 mois pour l'étude du DT2 et de ses conséquences microvasculaires. Afin de répondre aux questions que nous nous sommes posées, nous avons adopté le plan d'étude suivant :

- Les modifications des différents paramètres biochimiques plasmatiques au cours de l'évolution du syndrome diabétique seront analysés pour déterminer si le RHC, à lui seul, est capable d'induire un DT2 chez le modèle d'expérimentation choisi.
- Nous observerons au niveau de la rétine les modifications induites par la chronicité de l'hyperglycémie et étudierons le rôle de la BHR dans la protection des différentes couches de la rétine ainsi que les modifications morphologiques dues à son altération au cours du diabète. Pour cela, nous avons exploré les coupes histologiques rétiniennes de l'embryon et de l'adulte sain et nous les avons comparés à celles du diabétique. D'abord sans marquage pour voir l'ensemble des structures, puis aux marquages successifs par le VEGF et la VE-cadhérine.

PARTIE A : APPROCHE THEORIQUE

CHAPITRE I : APPROCHE THEORIQUE

CHAPITRE I : CONTEXTE DE L'ETUDE

SECTION I : LA RETINOPATHIE DIABETIQUE

I.1. EPIDEMIOLOGIE DE LA RD

D'importantes études épidémiologiques menées par l'UCCT pour le diabète de type 1 et par l'UKPDS pour le diabète de type 2 nous ont permis de mieux comprendre l'incidence des complications rétinienne de la rétinopathie diabétique.

On estime qu'environ 40 % des diabétiques sont porteurs d'une rétinopathie, ce qui représenterait environ 1 000 000 de patients en France (UKPDS, 2007).

La survenue d'un œdème maculaire chronique est la première cause de mal-voyance chez les patients diabétiques de type 2 (elle atteint environ 10% de la population diabétique), soit de par les complications de la rétinopathie diabétique proliférante (hémorragie intra-vitréenne, décollement de la rétine, glaucome néovasculaire). Après 15ans de diabète, environ 2% des patients sont aveugles. La prévalence de la rétinopathie diabétique croît avec la durée du diabète. Elle est supérieure à 80% après 15ans d'évolution.

La rétinopathie diabétique est aussi fréquente au cours du diabète de type 1 qu'au cours du diabète de type 2 (Racciah, 2004) :

- Dans le diabète de type 1, la RD ne survient en général pas avant 7 ans d'évolution ; après 20 ans d'évolution, 90 à 95 % des diabétiques de type 1 ont une RD, dont 40 % une RD proliférante.
- Dans le diabète de type 2, 20 % des diabétiques de type 2 ont une RD dès la découverte de leur diabète. Le risque à long terme des diabétiques de type 2 est moins celui d'une rétinopathie proliférante (20 % des patients) que celui d'un œdème maculaire (60 % des patients).

I.2. STADES D'EVOLUTION DE LA RD

L'évolution de la rétinopathie diabétique est habituellement lente, et se fait progressivement tout au long de la vie du diabétique. Elle regroupe les manifestations rétinienne spécifiques du diabète et représente un ensemble anatomo-clinique et fonctionnel qui évolue progressivement vers des troubles de la vision jusqu'au stade ultime de cécité.

CHAPITRE I : APPROCHE THEORIQUE

Hyperperméabilité - fragilité capillaire - ischémie rétinienne.

Deux grandes phases cliniques séparées par une phase charnière :

I.2.1. Phase non proliférative, préclinique

- ☞ **Aucun retentissement fonctionnel** sur l'acuité visuelle, microanévrismes, microterritoires de non-perfusion ou d'hémorragies, hyperperméabilité de la BHR, exsudats durs.
- ☞ **Maculopathie oedémateuse** : forme particulière, plus tardive, principale cause de baisse de l'acuité visuelle chez le diabétique. Fréquence = 18% après 20 ans de DNID.

I.2.2. Phase pré-proliférative

Phase intermédiaire caractérisée par des **lésions ischémiques étendues** secondaire à **l'occlusion des capillaires**. Annonçant le passage à une forme proliférative dans l'année chez 50% des patients et un risque imminent de saignement chez un tiers d'entre eux.

I.2.3. Phase proliférative

Apparition de vaisseaux pathologiques, les **néovaisseaux**, dont la croissance est stimulée par l'ischémie. Ces vaisseaux fragiles sont responsables **d'hémorragies pré-rétiniennes ou intravitréennes**. L'évolution cicatricielle crée des brides de traction et des **décollements rétiniens**. Les néovaisseaux iriens conduisent au redoutable **glaucome néovasculaire**. Cette phase proliférante expose à la cécité dont le risque passe alors à 50% dans les 5 ans.

I.3. FACTEURS DE RISQUE

L'hyperglycémie apparaît comme une cause principale de la RD. Cette idée est soutenue par des données du DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) qui indiquent qu'un contrôle strict de la glycémie peut retarder l'apparition et/ou améliorer la sévérité de cette pathologie (1993). **L'hypertension** augmenterait l'incidence des complications du DT2 ainsi que **la durée du diabète (U.K.P.D.S, 2003)**.

I.4. TRAITEMENTS

- ☞ **Contrôle glycémique et traitement de l'hypertension artérielle**

CHAPITRE I : APPROCHE THEORIQUE

Contrôle trimestriel de l'hémoglobine glyquée :

- **Un taux normal est de 4 à 6%;**
- **Chaque augmentation de 1% au delà d'un taux de 6% correspond à une élévation de la glycémie moyenne de ≈ 0.3 g/l;**

☞ **Photocoagulation laser, cryothérapie et microchirurgie (ou vitrectomie)**

☞ **Traitements expérimentaux et traitements adjuvants**

- Rôle des facteurs de croissance : VEGF ++
- Traitement anti-angiogéniques ?
- Traitements par somatostatine
- Inhibiteurs de la Protéine Kinase C

SECTION II : STRUCTURE ET FONCTIONNEMENT DU SYSTEME VASCULAIRE RETINIEN

II.1. LE RESEAU VASCULAIRE

Le tissu vasculaire est composé de vaisseaux d'artères et de veines. Les artères ont pour principal rôle de conduire le sang en provenance du cœur vers le réseau capillaire, et les veines de conduire le sang en provenance des organes vers le cœur.

II.1.1. Structure des micro-vaisseaux

Les capillaires sont des vaisseaux sanguins extrêmement ténus, dont la structure se limite à une assise de **cellules endothéliales**, une lame basale, et une couche incomplète de **péricytes**.

Cette finesse leur permet de remplir leur fonction d'échange entre le sang et le milieu intérieur.

Contrairement aux vaisseaux de gros calibre, les capillaires ne peuvent contenir qu'un très faible volume de sang et leur section étroite produit une forte résistance à l'écoulement sanguin, les capillaires sont dits **résistifs**. Les capillaires sont organisés en réseaux très interconnectés. Une artériole alimente le réseau et une veinule le draine.

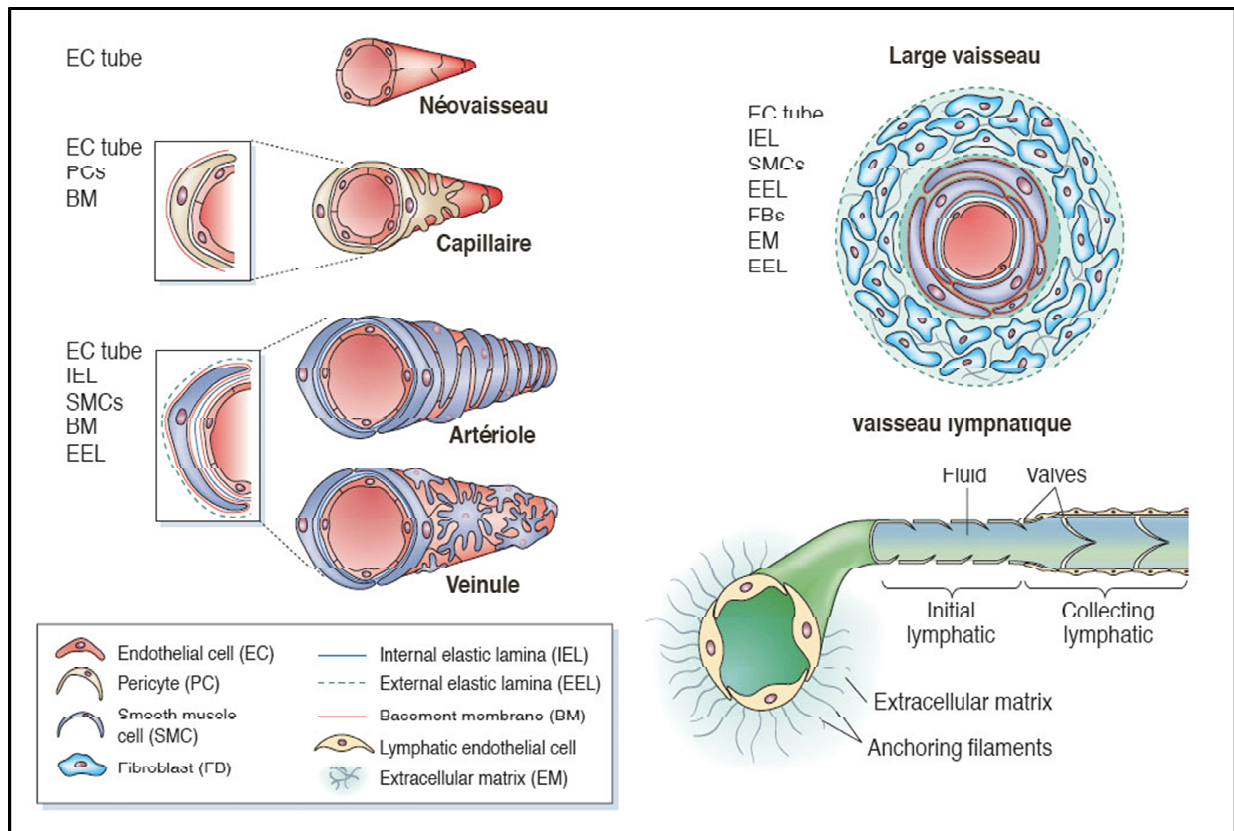


Figure 1. Les différents types de vaisseaux sanguins. D'après (Rakesh K Jain, Nature Medicine, 2003)

II.1.2. Les microvaisseaux au sein de l'oeil

II.1.2.1. Anatomie du globe oculaire

Le globe oculaire est tapissé de 3 tuniques :

- La **tunique fibreuse** (sclérotique et cornée) qui lui donne sa forme et protège ses parties internes.
- La **tunique vasculaire** (choroïde, corps ciliaire et iris) qui l'irrigue en partie.

Contenant 3 couches :

- **La couche des vaisseaux**, qui contient de très nombreuses artères et veines tributaires du système des vaisseaux ciliaires.
- **La couche choriocapillaire** caractérisée par la présence d'un important réseau capillaire dépendant des vaisseaux de la couche précédente.
- **La membrane de Bruch**, qui correspond à une mince couche de microfibrilles collagènes et élastiques recouverte d'un côté par la membrane basale des capillaires de la couche choriocapillaire et de l'autre par la membrane basale de l'épithélium pigmentaire de la rétine.

CHAPITRE I : APPROCHE THEORIQUE

- c- La **tunique nerveuse**, la couche la plus interne, que constitue la **rétine**. Elle recouvre les trois quarts postérieurs de l'œil et a pour fonction de recevoir les signaux visuels focalisés par la cornée et ajustés par le cristallin, puis de les traiter avant de les transmettre au cerveau via le nerf optique.

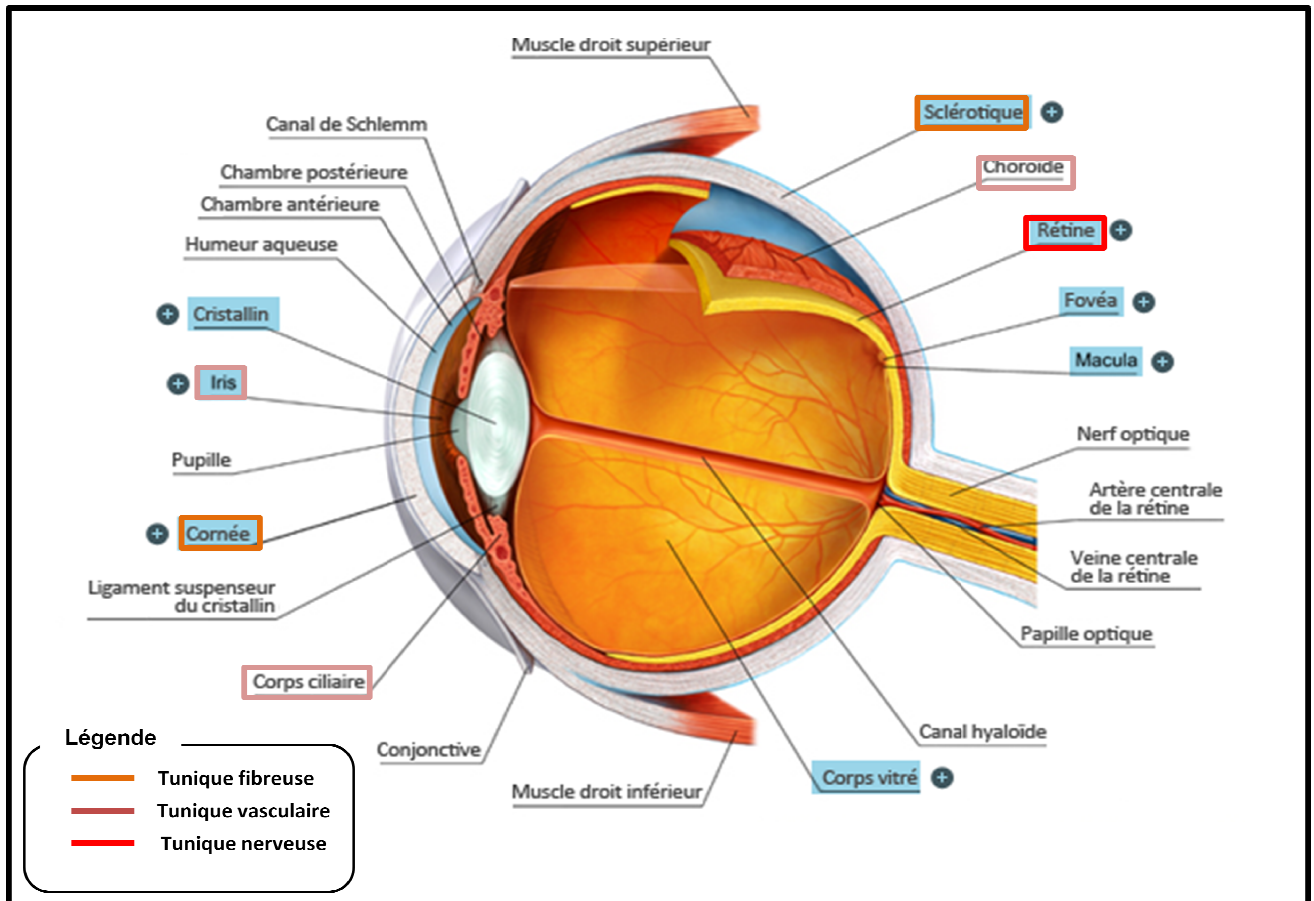


Figure 2. Anatomie de l'œil humain
(Bernard J.-A., Encyclopedia universalis, 2007 modifiée)

II.1.2.2. La rétine

La rétine visuelle est composée de deux feuillets, un feuillet externe **pigmenté** et un feuillet interne **neuro-sensoriel** (figure 3).

- **La rétine pigmentaire**

Le feuillet externe est formé par un épithélium simple. La face apicale de ces cellules présente des expansions qui enveloppent le segment externe des photorécepteurs. La face basale repose sur la membrane de Bruch qui réunit la choroïde à la rétine. Il existe une mélanogénèse active dans ces cellules tout au long de la vie. Cet épithélium pigmentaire de la rétine se poursuit au niveau de l'iris, dont il constitue la face postérieure.

- **La rétine neuro-sensorielle**

Les couches

La structure réceptrice de la lumière est contenue dans le feuillet interne de la rétine. Ce feuillet est composé de dix couches successives adossées à l'épithélium pigmentaire.

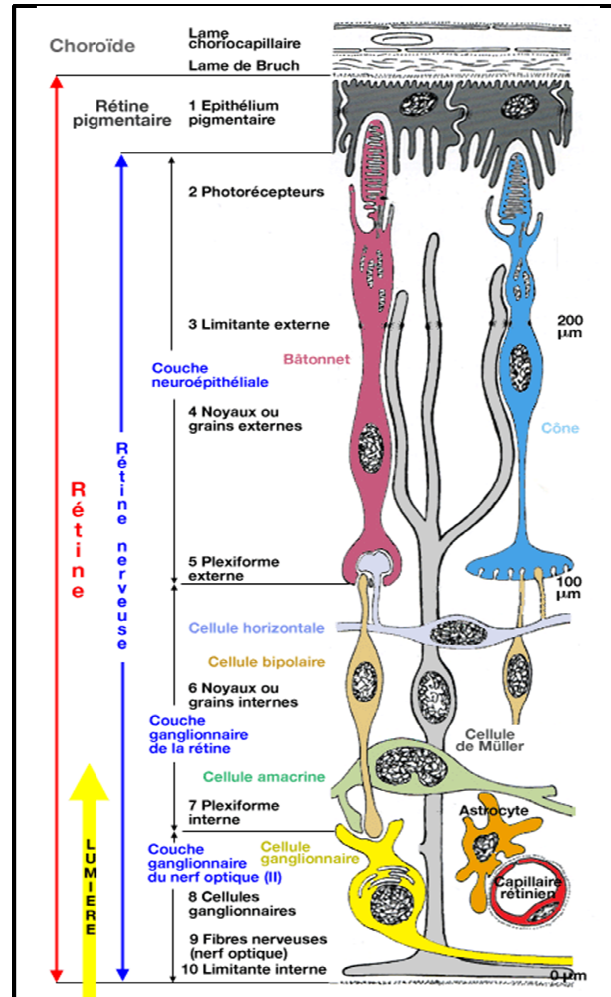


Figure 3. Structure de la rétine (Renard et al., 1982)

II.1.2.3. Vascularisation rétinienne

La rétine est un tissu particulièrement irrigué et le seul endroit du corps où il est possible d'examiner directement les vaisseaux sanguins qui traversent sa surface extérieure (examen du fond d'œil). Il représente aussi un bon modèle d'étude de la vascularisation du fait de sa constitution alternée entre lits vasculaires et structures avasculaires.

Ces lits vasculaires sont inégalement répartis dans deux régions, majoritairement à la surface de la rétine mais également enfouis dans la couche des cellules bipolaires.

CHAPITRE I : APPROCHE THEORIQUE

Les cellules endothéliales, en plus des péricytes et cellules de Müller, participent à la formation et à la fonction des **barrières hémato-rétiniennes**, on en distingue deux : BHR interne, constituée par les microvaisseaux rétinien, et la BHR externe, qui est l'épithélium pigmentaire lui-même, toutes deux rendues étanches par l'existence de **jonctions serrées** entourant les cellules de l'endothélium responsable de la perméabilité capillaire et maintien d'un environnement biochimique particulier dans le compartiment extravasculaire. Elle assure également un rôle de protection pour les éléments nerveux de la rétine contre certains facteurs circulants.

II.2. L'ENDOTHELIUM VASCULAIRE

II.2.1. Structure de l'endothélium

L'endothélium est constitué d'un épithélium simple squameux qui forme une barrière mince et un revêtement lisse. Ces caractéristiques sont retrouvées dans les organes ayant une fonction d'absorption, de sécrétion et de filtration, car elles permettent de réduire les frictions entre les cellules de l'endothélium et le sang.

II.2.2. Les rôles de l'endothélium

L'endothélium est un organe endocrine principal multifonctionnel qui exerce des actions autocrines et paracrines importantes à travers leur influence sur les cellules du muscle lisse ou les cellules circulantes du sang.

Il a pour rôle de :

- Réguler le tonus musculaire par la relâche d'agents vasoactifs (vasorelaxants et vasoconstrictants, les plus importants sont illustrés dans le tableau 1 dans les annexes).
- Contrôler la perméabilité vasculaire en assurant le transport de substances transendothéliales vers l'espace interstitiel.
- Contrôler la résistance vasculaire périphérique.
- Contrôler l'adhésion et la migration des cellules sanguines dans les tissus et par là il régule les réponses immunes et inflammatoires. Ce passage se fait au niveau des veinules à haut endothélium (HEV, « High Endothelial Venules »), sites privilégiés de pénétration des lymphocytes retrouvés dans les organes lymphoïdes secondaires exceptée la rate.

- Former de nouveaux vaisseaux (processus appelé angiogenèse).
- Contrôler la coagulation et la fibrinolyse.
- Diminuer la friction entre le sang et les parois vasculaires.
- Contrôler la pression sanguine.

L'endothélium joue donc un rôle central dans le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire.

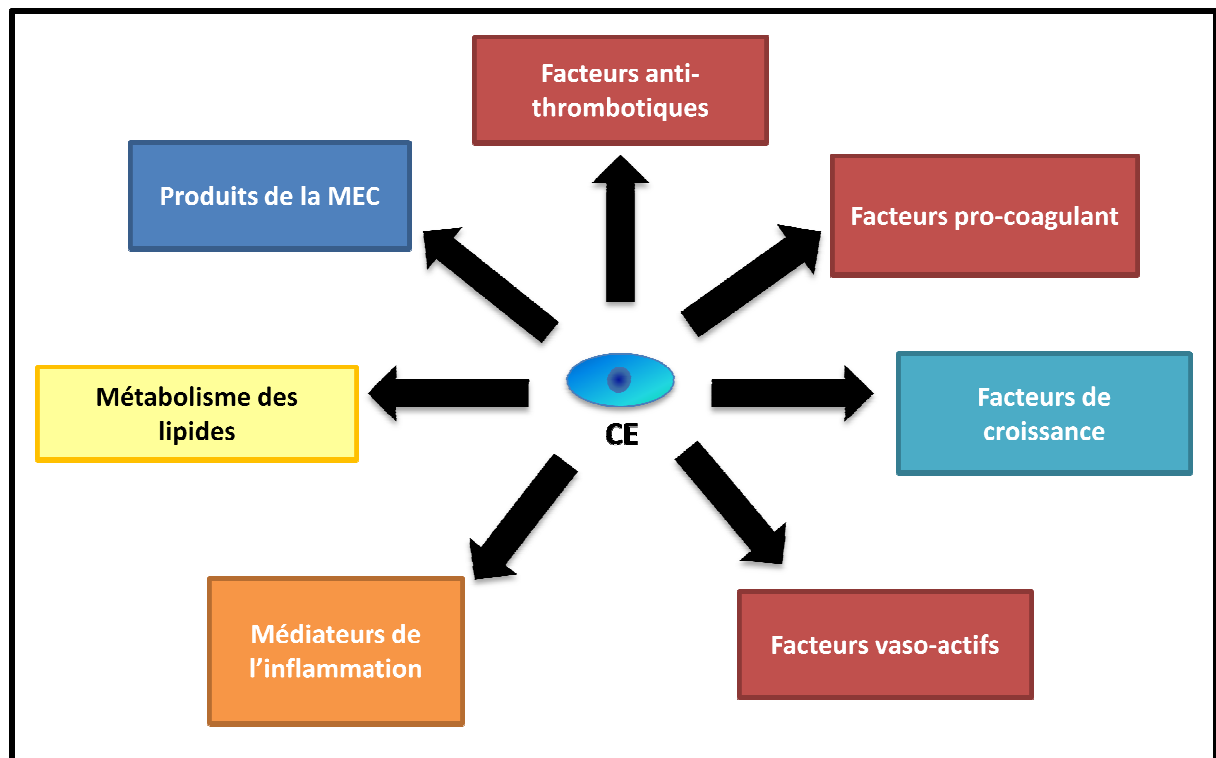


Figure 4. Produits d'expression et/ou de sécrétion des cellules endothéliales relatifs à la physiologie des vaisseaux (Sumpio et al., 2002)

II.2.3. Développement vasculaire

II.2.3.1. La vasculogenèse

Durant le développement embryonnaire, un réseau vasculaire primitif se met en place grâce au phénomène de vasculogenèse (Carmeliet, 2003; Jain, 2003). Il s'agit de la formation des premiers vaisseaux à partir de cellules précurseurs endothéliaux (ou angioblastes) qui se différencieront en cellules endothéliales.

Le devenir des vaisseaux (artères, veines, et vaisseaux lymphatiques) est en partie déterminé génétiquement, très tôt dans le développement (Ferguson et al., 2005).

II.2.3.2. L'angiogenèse

II.2.3.2.1. Définition et mécanisme

L'angiogenèse définit le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins par extension ou remodelage des vaisseaux préexistants (**Byrne et al., 2005; Ferguson et al., 2005**). Ce phénomène intervient au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte dans deux cas physiologiques précis : la réparation tissulaire et le cycle menstruel. L'angiogenèse permet l'obtention d'un réseau fonctionnel optimal, et parfois spécialisé, comme c'est le cas pour l'endothélium fenêtré.

L'angiogenèse est également associée à de nombreuses pathologies telles que la polyarthrite rhumatoïde, la rétinopathie diabétique, ou la progression tumorale (**Norrby, 2006**). Afin de pouvoir à terme lutter contre ces pathologies, il est donc d'un grand intérêt de comprendre les mécanismes qui régissent l'angiogenèse, tant physiologique que pathologique.

Il existe un grand nombre de facteurs régulateurs de l'angiogenèse, soit angiogéniques, soit angiostatiques dont l'action coordonnée, maintient chez l'adulte l'endothélium dans un état quiescent. L'équilibre peut-être basculé en faveur de l'angiogenèse par excès des facteurs angiogéniques et/ou déficit des facteurs angiostatiques (switch angiogénique), et nous nous intéresseront dans cette étude au VEGF.

Les différentes étapes ainsi que les intervenants cytokiniques des deux processus de développement vasculaire, à savoir la vasculogenèse et l'angiogenèse, sont schématisés ci-dessous (**figure 5**), où les molécules clés de notre étude ont été marquées en rouge pour mettre en exergue leurs niveaux d'intervention.

CHAPITRE I : APPROCHE THEORIQUE

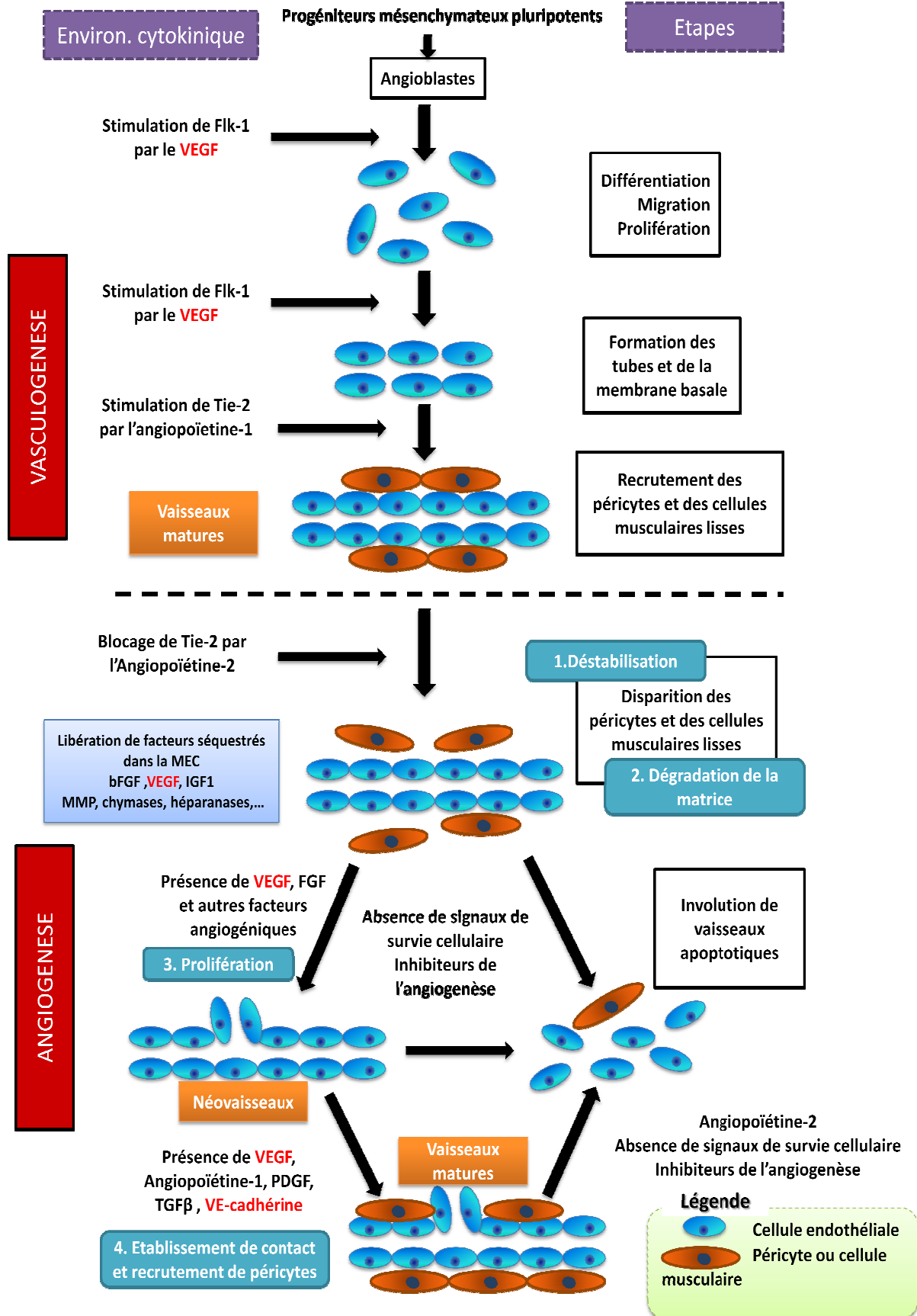


Figure 5. Vasculogénèse et étapes de l'angiogénèse, mécanismes régulateurs. (D'après Li et al. 2000; et Carmeliet 2003)

II.2.3.2.2. Le VEGF, médiateur principal de l'angiogenèse

a-Généralités

Le VEGF est le principal facteur angiogénique. Il fut tout d'abord décrit en 1989 comme un facteur mitogénique des cellules endothéliales et un facteur augmentant la perméabilité vasculaire, initialement appelé facteur de perméabilité vasculaire (VPF) (**Keck, P.J. et al. 1989**), il est le seul facteur angiogénique à posséder cette caractéristique.

Il s'agit d'une glycoprotéine homodimérique de 34 à 46 kDa dont la séquence est faiblement homologue des chaînes A et B du Platelet Derived Growth Factor (PDGF). Actuellement, cinq gènes de protéines de la famille du VEGF ont été décrits, plus des isoformes d'origine virale.

L'étude de cette molécule a révélé son importance considérable dans l'angiogenèse et plus généralement dans l'ensemble des processus de formation des vaisseaux. L'inactivation d'un seul allèle du VEGF chez la souris résulte en une mort embryonnaire entre le 10^{ème} et le 12^{ème} jour, due à des défauts de vascularisation importants (**Carmeliet, P. et al. 1996; Ferrara, N. et al. 1996**).

Ce facteur de croissance agit sur les cellules exprimant ses récepteurs de type I (VEGFR1 ou Flt1) et de type II (VEGFR2 ou Flk1). (**Ferrara et al., 1996 ; Byrne et al., 2005**).

b- Fonctions

L'ensemble des effets décrits dans ce chapitre concerne le VEGF-A, également appelé VEGF (dénomination qui sera utilisée par la suite dans ce manuscrit).

- ☞ Perméabilité
- ☞ Prolifération
- ☞ Survie
- ☞ Migration

II.2.7. LES JONCTIONS ENDOTHELIALES

Les jonctions intercellulaires constituent les points d'ancrage des cellules endothéliales entre elles (**Esser et al., 1998 ; Carmeliet et al., 1999 ; Grazia Lampugnani et al., 2003 ; Dejana, 2004; Broman et al., 2006; Gavard and Gutkind, 2006**).

Ces jonctions qui maintiennent jointives les cellules assurent la fonction de barrière de l'endothélium. Pourtant aujourd'hui, il est admis que les jonctions n'ont pas uniquement un rôle architectural. Elles constituent également des structures permettant la transmission de

CHAPITRE I : APPROCHE THEORIQUE

signaux qui régulent des phénomènes tels que la **perméabilité vasculaire**, l'**inhibition de contact** ou l'**apoptose**. Les jonctions sont impliquées dans la signalisation intracellulaire grâce aux interactions de leurs composantes avec des facteurs de transcription, des récepteurs de facteurs de croissance, ou des protéines de signalisation.

Il existe quatre types de jonctions endothéliales : **les complexes adhaerentes**, **les jonctions communicantes**, **les jonctions serrées** et **les jonctions adhérentes**, toutes décrites ci-après.

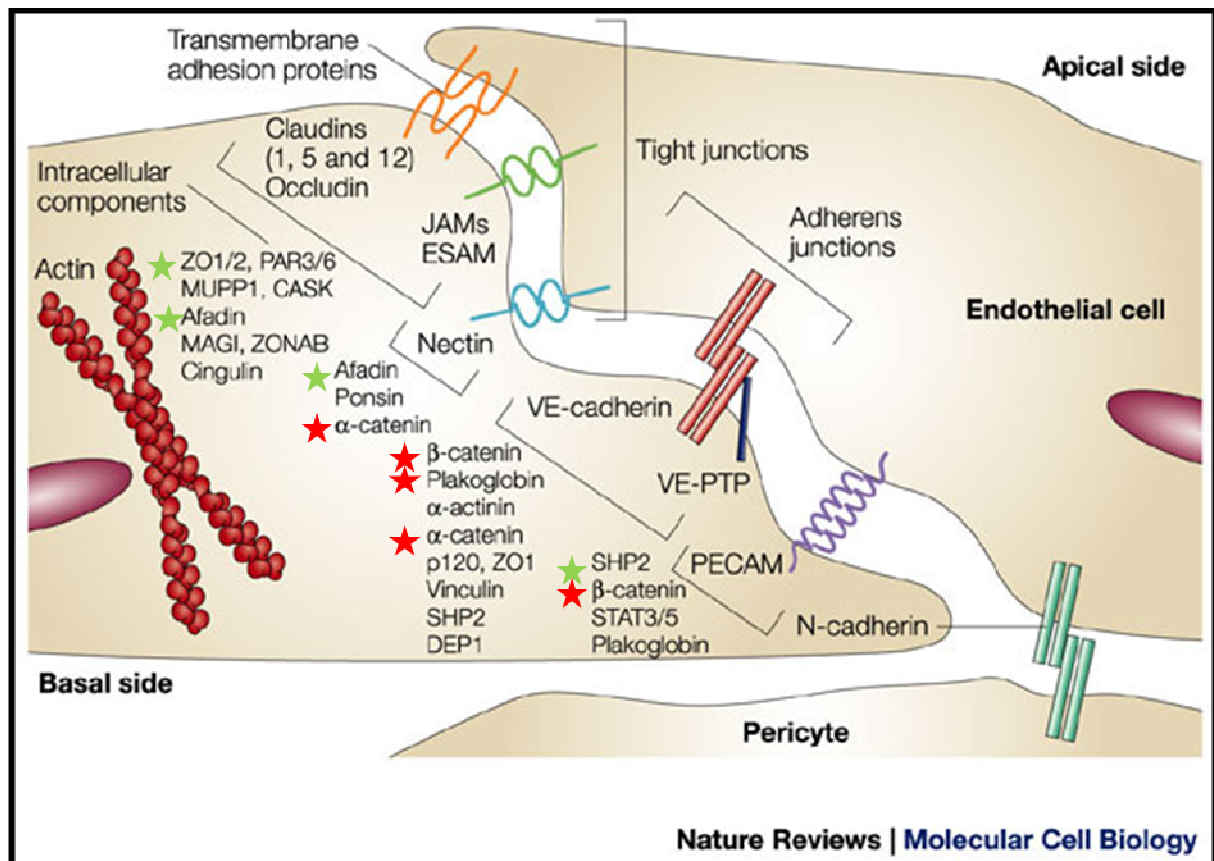


Figure 6. Diagramme de l'organisation moléculaire des jonctions endothéliales et de leur entrelacement. D'après (Dejana, 2004).

Ce schéma illustre la difficulté à situer spatialement les différentes structures adhésives (jonctions serrées, jonctions adhérentes, le couple nectine/afadine –voire détails en annexe I- et PECAM) rencontrées dans l'endothélium vasculaire. Chacune comporte des protéines communes à une ou plusieurs autres jonctions. Les **étoiles rouges** marquent les protéines traditionnellement associées aux jonctions adhérentes et les **étoiles vertes**, celles associées aux jonctions serrées.

II.2.7.1. Les complexes adhaerentes

La majorité des endothélias ne présente pas de jonctions desmosomales aussi bien définies que celles des épithélias. Cependant, certains tissus tels que les vaisseaux lymphatiques et les micro-vaisseaux disposent de structures apparentées aux desmosomes, les complexes adhaerentes (Dejana, 2004; Zhou et al., 2004).

La VE-cadhérine des complexes adhaerentes est associée de façon indirecte aux filaments intermédiaires par le biais de la desmoplakine (Valiron et al., 1996; Kowalczyk et al., 1998; Gallicano et al., 2001; Leung et al., 2001; Venkiteswaran et al., 2002 ; Calkins et al., 2003; Cattelino et al., 2003). Bien qu'encore très peu étudiées, ces jonctions semblent être des acteurs importants dans la vasculogénèse embryonnaire et de par leur liaison aux filaments intermédiaires, constitueraient des acteurs majeurs dans la régulation de la perméabilité vasculaire, la vasculogénèse et/ou l'angiogénèse.

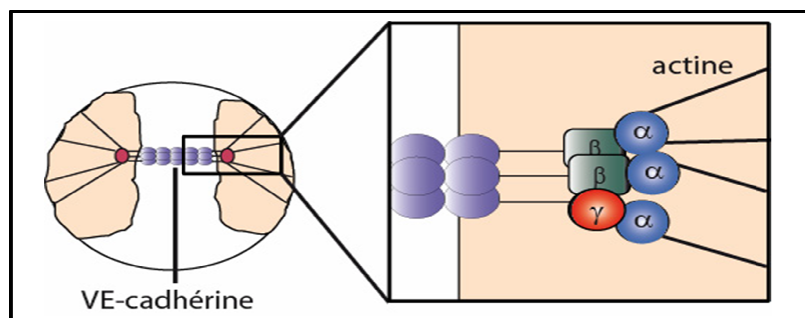


Figure 7. Composition et organisation de la jonction adhérente inter-endothéliale traditionnellement décrite. D'après (Lampugnani et al., 1995; Navarro et al., 1995).

II.2.7.3. Les jonctions serrées (zonula occludens)

Les jonctions serrées sont présentes aussi bien dans les épithélias que dans les endothélias. Elles constituent des structures jonctionnelles impliquées dans la régulation de la perméabilité. Il existe trois types de protéines transmembranaires qui participent à ce type de jonctions : l'occludine, les claudines, et les molécules d'adhérence jonctionnelle (JAM, Junctional Adhesion Molecules). (Bazzoni and Dejana, 2004).

II.2.7.4. Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes sont présentes dans tout le système vasculaire (Dejana, 2004). La protéine majeure de ces jonctions est la VE-cadhérine (voir paragraphe II.2.7.6). En association avec ses partenaires cytoplasmiques qui la relie aux différents types de

CHAPITRE I : APPROCHE THEORIQUE

cytosquelette, elle élabore des jonctions solides et cohésives. Leur ouverture finement régulée permet à l'endothélium d'assurer sa fonction de barrière semi-perméable. De plus, les jonctions adhérentes fonctionnent comme des senseurs moléculaires qui, en percevant les signaux extracellulaires et en les transmettant, permettent l'adaptation de la cellule à son micro-environnement (**Perez-Moreno and Fuchs, 2006**).

Les jonctions adhérentes exercent un rôle majeur dans de nombreux phénomènes comme la morphogenèse embryonnaire du système vasculaire, le maintien de l'intégrité et la réparation tissulaires chez l'adulte (**Gumbiner, 2005**).

II.4. LA VE-CADHERINE, PRINCIPALE CADHERINE ENDOTHELIALE

II.4.1. Structure

La VE-cadhérine est une cadhérine classique de type II de 135 kDa, dont l'ADNc a été mis en évidence pour la première fois en 1991 (**Suzuki et al., 1991**). Sa localisation aux contacts intercellulaires et son expression spécifiquement restreinte à l'endothélium ont été révélées en 1992 (**Lampugnani et al., 1992**).

La VE-cadhérine est composée d'un domaine extracellulaire qui comprend cinq modules EC, qui abrite des sites de liaison au calcium au niveau des régions inter-modulaires et leur saturation serait à l'origine de la rigidité de ce domaine (**Nagar et al., 1996; Pertz et al., 1999; Shapiro et al., 1995**); d'un domaine transmembranaire ; et d'une queue cytosolique qui permet l'interaction avec ses partenaires intracellulaires (**figure 9**) (**Nollet et al., 2000**).

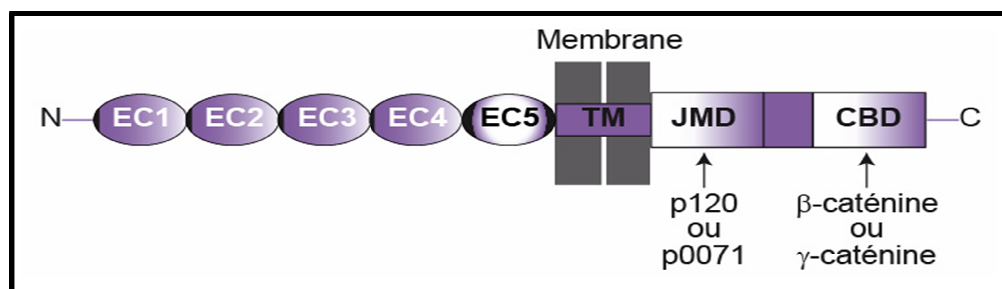


Figure 8. Organisation modulaire des cadhérines classiques. D'après (Nollet et al., 2000)

Tout comme les autres cadhérines, la VE-cadhérine dispose, dans son domaine intracellulaire, de deux régions très conservées régissant les interactions avec des caténines :

CHAPITRE I : APPROCHE THEORIQUE

- Un domaine, proche de la membrane, le JMD (JuxtaMembrane Domain), permet l'interaction avec p120 ou une protéine qui lui apparentée, p0071 ;
- Et un domaine en position C-terminal, capable d'interagir avec les caténines, le CBD (Catenin-Binding Domain) (Nollet et al., 2000; Wallez et al., 2006b).

La queue cytoplasmique contient neuf résidus tyrosyles susceptibles d'être phosphorylés. Le résidu Y685, notamment phosphorylé par Src (Wallez et al., 2006a), permet l'association de la VE-cadhérine à la kinase Csk (C-terminal Src kinase) (Baumeister et al., 2005). La phosphorylation des résidus Y658 et Y731 est suffisante pour maintenir les cellules endothéliales dans un état angiogénique, c'est-à-dire à même de migrer (Wallez et al., 2006b).

II.4.2. Auto-association

La VE-cadhérine est garante de l'intégrité de l'endothélium, et l'interférence avec ses fonctions entraîne une perturbation de la perméabilité (Gulino et al., 1998 ; Corada et al., 1999). Sans cette cadhérine, les cellules endothéliales sont incapables de s'organiser en structures vasculaires (Vittet et al., 1997), ou même de survivre (Carmeliet et al., 1999), et le développement embryonnaire avorte très précocement (Gory-Faure et al., 1999). Toutes ces fonctions sont étroitement liées aux capacités adhésives de la VE-cadhérine, or le voile sur l'organisation quaternaire de cette protéine se lève à peine.

Selon plusieurs études, l'union de deux cellules par des molécules identiques de cadhérine nécessite deux types d'interaction entre les domaines N-terminaux de CAD1 (figure 8).

Ces interactions aboutissent à la constitution d'une structure moléculaire en fermeture éclair (cf. Annexe I).

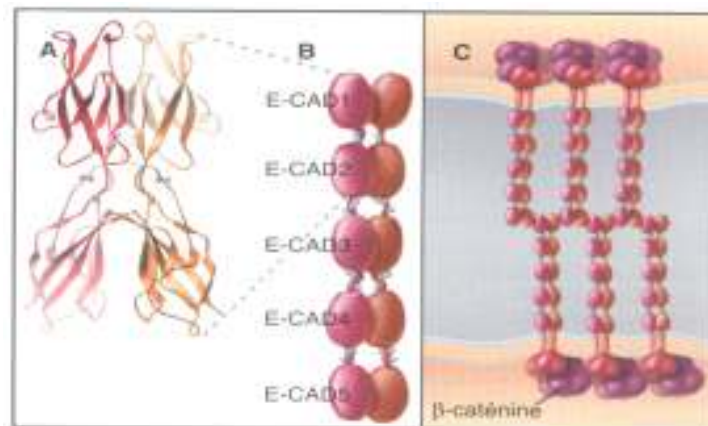


Figure 9. Structure moléculaire et mécanisme hypothétique d'adhérence des cadhérines (Schéma récapitulatif d'après T.D. Pollard, W.C. Earnshaw, 2004)

II.4.3. Fonctions

Les propriétés adhésives de la VE-cadhérine ont été confirmées en transfectant son ADNc dans des cellules CHO, qui acquièrent alors la capacité de former des agrégats (**Breviario, F. et al. 1995**). Les fonctions adhésives intercellulaires de la VE-cadhérine lui confèrent également un rôle crucial dans le contrôle de la perméabilité vasculaire, et la transmigration leucocytaire.

L'importance de la VE-cadhérine dans ce processus a ensuite été démontrée par son invalidation génique. Les cellules endothéliales dépourvues de VE-cadhérine sont toujours capables de former un plexus vasculaire primitif, mais le remodelage vasculaire n'a pas lieu, et les cellules endothéliales tendent à se détacher et les vaisseaux se collapent et régressent, ce qui conduit finalement à une létalité embryonnaire au stade 9,5 jpc (**Gory-Faure, S. et al. 1999**).

SECTION III : GLUCOTOXICITE ET DYSFONCTION VASCULAIRE DANS LA RD

III.1. ROLE DE L'HYPERGLYCEMIE

Il est aujourd'hui admis que l'hyperglycémie est le facteur initial essentiel menant aux complications microvasculaires liées au diabète. Cependant, les mécanismes de la toxicité du glucose au niveau des tissus cibles des complications du diabète sont multiples.

Plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer les altérations de la fonction et de la structure des microvaisseaux réiniens au cours du diabète. Elles interviennent probablement de concert dans la genèse de la maladie (**Wautier JL et al., 1994 ; 1996 ; MP et al., 2003 ; Wautier MP et al., 2004**).

III.2. LES HYPOTHESES PATHOGENIQUES PROPOSEES

III.1.1. Hypothèse d'hémodynamique

L'hyperglycémie induirait en effet une perte de l'autorégulation rétinienne du flux sanguin associée à une hyperperméabilité de la paroi microvasculaire (**Porta, 1996**).

Au cours du développement de la rétinopathie diabétique, la **perte de la régulation du tonus vasculaire** a été mise en évidence, se caractérisant par l'**augmentation de la pression**

et du débit sanguin et la vasodilatation chronique des microvaisseaux (Zatz R. *et al.*, 1986).

III.1.2. Hypothèse biochimiques

a- Voie des polyols

Dans la voie des polyols (encore appelée voie du sorbitol), le glucose est d'abord réduit en sorbitol par l'aldose réductase, le sorbitol étant ensuite oxydé par la sorbitol déshydrogénase en fructose, avec réduction parallèle du cofacteur NAD⁺ en NADH (Brownlee M. , 2001). Parmi les conséquences de l'activation en excès de cette voie par l'hyperglycémie chronique, la diminution du rapport NADP⁺/NADPH, responsable de la non-régénération du glutathion réduit.

b- Voie de la PKC

La protéine kinase C (PKC) est activée par le diacyl-glycérol (DAG), produit en excès par l'hyperglycémie, ou indirectement, via les AGE et leur récepteur RAGE, l'augmentation du flux de glucose dans la voie des polyols, et l'augmentation du stress oxydant enfin (Brownlee M. , 2001). Les conséquences pathologiques de l'activation de la PKC sont multiples, anomalies de la régulation du flux sanguin rétinien par réduction de la production de NO et/ou augmentation de l'endothéline 1, augmentation de la perméabilité endothéliale, et du VEGF, hyperproduction de la matrice extracellulaire (expression du TGF- β , de la fibronectine et du collagène IV), surexpression du PAI-1, inhibiteur de la fibrinolyse, activation du facteur de transcription nucléaire NF- κ B (cf. annexe II).

c- Voie des hexosamines

L'activation de la voie des hexosamines par l'hyperglycémie chronique conduit à une augmentation de la production de TGF- α , de TGF- β et de PAI-1, et amplifie les effets géniques du NF- κ B (Brownlee M., 2001).

d- La glycosylation non-enzymatique

Nommée aujourd'hui **réaction de Maillard** car découverte *in vitro* par Louis-Camille Maillard en 1912 , la glycation non enzymatique des protéines (Baynes *et al.*, 1989), mais aussi de l'ADN (Lee et Cerami, 1990) et des lipides (Bucala *et al.*, 1993) à partir du glucose ou encore du fructose, conduit à la formation d'intermédiaires métaboliques instables, pouvant se réarranger de façon diverse et donner naissance à de multiples produits terminaux de la glycation avancée (AGE), entraînant des altérations de la structure et de la fonction des molécules glyquées (Wautier J.-L. *et al.*, 1998 ; 2001) (Figure 10).

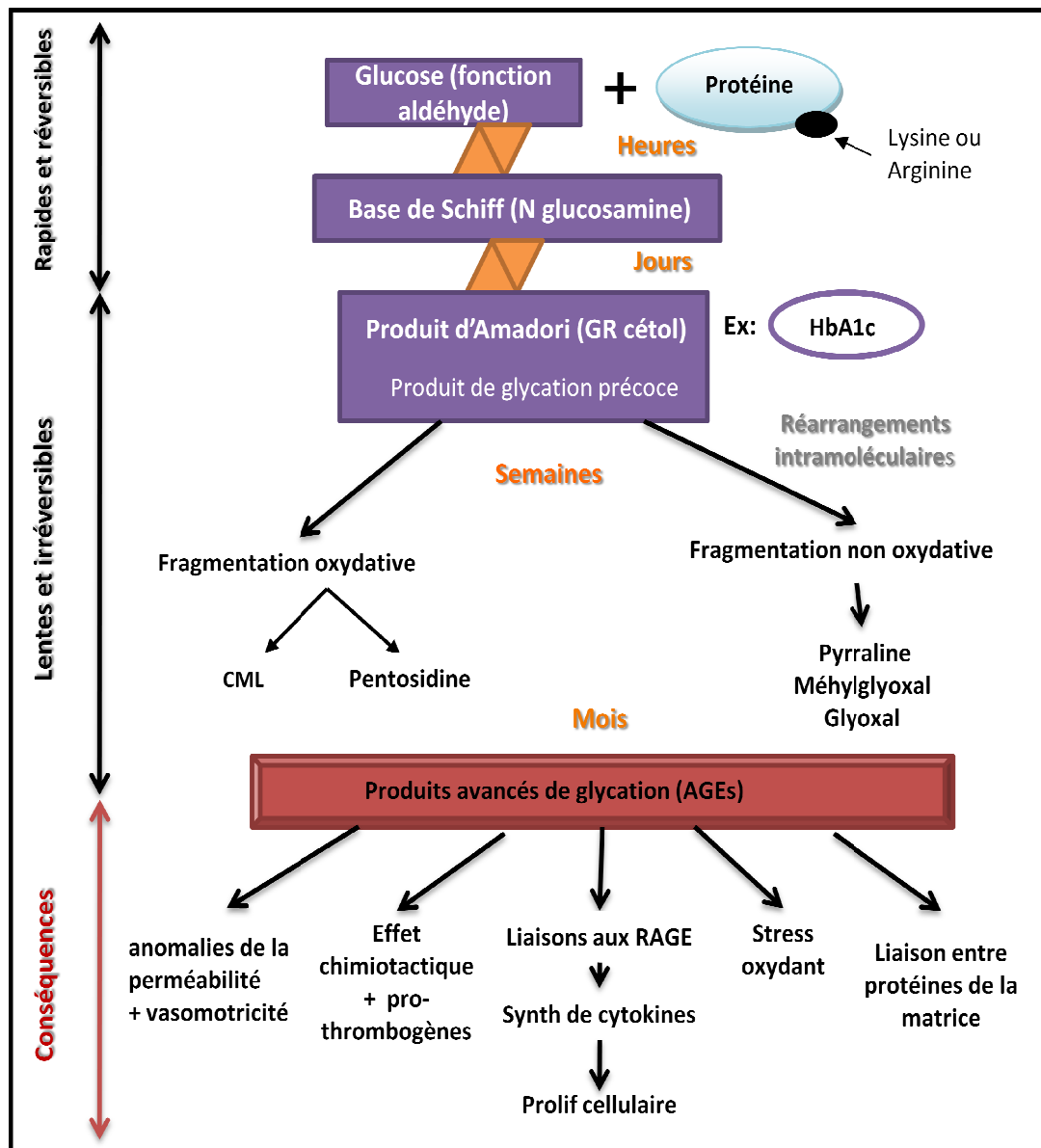


Figure 10. La voie de la glycation non enzymatique et ses conséquences (Monnier VM, 2003)

IV.1.3. LA PLACE DES AGE DANS NOTRE ETUDE

La formation et l'accumulation des AGE sont en effet accélérées au cours du diabète (Guthrow *et al.*, 1979; Hammes *et al.*, 1999) et reliées sur le plan clinique aux complications vasculaires (Brownlee, 1995). Par exemple, la sévérité des complications microvasculaires observée chez les patients diabétiques atteints de rétinopathie a été corrélée avec les quantités d'AGE contenues dans le collagène de la peau (Beisswenger *et al.*, 1995) et dans le sérum (Ono *et al.*, 1998).

CHAPITRE I : APPROCHE THEORIQUE

La présence et l'accumulation progressive de produits d'Amadori (Schalkwijk *et al.*, 1999) et d'AGE (Stitt *et al.*, 1997) a été mise en évidence sur les protéines de la membrane basale des microvaisseaux rétiniens. Différents récepteurs aux AGE ont été localisés dans le lit capillaire rétinien: les composants p60 et p90 du complexe AGE-R ont été identifiés sur les deux types cellulaires rétiniens (Stitt *et al.*, 1997; Chibber *et al.*, 1997), RAGE est également présent dans les cellules microvasculaires rétiniennes, les cellules endothéliales (Yan *et al.*, 1994) et les péricytes (Yamagishi *et al.*, 1995).

Lors de la perfusion de rats normo-glycémiques avec de l'albumine glyquée (AGE), ce produit s'accumule dans les microvaisseaux rétiniens et dans les péricytes, colocalise avec les récepteurs aux AGE et induit l'épaississement de la membrane basale (Stitt *et al.*, 1997) ainsi que l'altération de la perméabilité de la BHR, associée à la surexpression dans la rétine du facteur de perméabilité VEGF (Stitt *et al.*, 2000a).

Différentes études *in vitro* montrent que les AGE inhibent la croissance des péricytes rétiniens (Yamagishi *et al.*, 1995; Chibber *et al.*, 1997; Ruggiero-Lopez *et al.*, 1997) alors qu'ils favorisent la multiplication des cellules endothéliales (Chibber *et al.*, 1997; Ruggiero-Lopez *et al.*, 1997).

IV.1.4. LE STRESS OXYDANT

Le stress oxydant réfère à une perturbation dans la balance métabolique cellulaire durant laquelle, la génération d'oxydants accable le système de défense antioxydant, que ce soit par une augmentation de la production d'oxydants et / ou par une diminution de la défense antioxydante, ce qui résulte en l'accumulation de radicaux libres causant dommages oxydatifs aux macromolécules du tissu hôte (Thomas, S.R. *et al.*, 2003 ; Wassmann S. *et al.*, 2004).

Les quatre voies intracellulaires qui paraissent activées par l'hyperglycémie (voire partie III.2 plus haut) sont la conséquence commune d'une augmentation de la production de l'ion superoxyde O₂⁻. Il existe au niveau vasculaire plusieurs sources ou systèmes enzymatiques qui, dans des conditions normales ou physiopathologiques, sont capables de produire de l'O₂⁻ et ses dérivés, appelés espèces réactives de l'oxygène ERO ou radicaux libres.

CHAPITRE II :
MATERIEL ET METHODES

II.1. MATERIEL BIOLOGIQUE

II.1.1. LE MODELE EXPERIMENTAL CHOISI ET SON REGIME ALIMENTAIRE

II.1.1.1. *Psammomys obesus* et son biotope

Au cours de notre étude, nous avons pris comme modèle les gerbilles diurnes issues de nos régions semi-désertiques *Psammomys obesus* (**Figure 11**). C'est un rongeur de la famille des Muridae sous-famille des Gerbillidae. Il a été décrit pour la première fois par CRETZSCHMAN en 1826. (Pour les autres modèles expérimentaux d'étude du DT2 cf. Annexe III).



Figure 11. *Psammomys obesus* au laboratoire (photo originale)

Dans son milieu naturel, au nord africain, *Psammomys obesus* se nourrit de Chenopodiacées halophiles pauvres en calories, il est donc normoglycémique.

Au cours des expérimentations nous avons d'abord procédé à la capture de notre modèle animal au niveau de la région de M'Sila et Biskra.

❖ Région M'Sila-Biskra

M'Sila (18 175 km²) est une région principalement agro-pastorale. Ses principales agglomérations sont M'Sila (le chef-lieu), Bou-Saâda, Sidi Aïssa et Ain El Melh. Située au centre et au nord du territoire algérien, elle constitue la continuité saharienne.

Biskra, chef-lieu de la Wilaya de Biskra, compte environ 245 000 habitants. Elle est localisée au S.E de l'Algérie et s'étend sur une superficie de près de 2167.20km².

La morphologie et la position géographique de ces deux wilayas leur confèrent un aspect écologique unifié représenté par la prédominance de la steppe qui couvre 63% de la superficie totale. Notons que la superficie affectée à l'agriculture représente 20%.

II.1.1.2. Echophysologie de l'animal

Le *Psammomys* est le seul Gerbillidé diurne actif de jour comme de nuit. Il pèse à l'état adulte, entre 80 et 120g, caractérisé par une petite taille (130-160mm), un pelage fauve de petites oreilles (10-12mm), une queue aussi longue que le reste du corps (115-140mm). Il atteint une longévité de trois ans.

C'est un rongeur actif, intelligent, très organisé, calme et familier, vivant seul. Il creuse des terriers très profonds (jusqu'à un mètre), communiquant à l'intérieur par des galeries à plusieurs étages et avec plusieurs sorties (moyen de fuite aux prédateurs). Ses terriers se trouvent sous les masses de buissons de plantes halophiles dont il se nourrit en découpant leurs tiges en petits rameaux qu'il emmagasine dans son terrier, la température de ses terriers varie entre 20 et 22°C sur toute l'année.

Les mâles et les femelles vivent séparément sauf en périodes de reproduction (octobre-mai), où les conditions climatiques deviennent favorables.

La gestation dure 25 jours, le développement post-natal est rapide bien que l'allaitement continu jusqu'à la 4^{ème} semaine. Le rat des sables diminue des dépenses hydriques en produisant une urine très concentrée.

II.1.1.3. Métabolisme de l'animal et son importance dans notre étude

Des études ont indiqué qu'un régime hypercalorique peut entraîner chez l'humain, avec le temps, des désordres métaboliques tels que l'hyperglycémie, une hyperlipidémie et une hyperinsulinémie, lesquels représentent d'importants facteurs de risque de complications cardiovasculaires. En effet, une association entre ces facteurs de risque et la dysfonction endothéliale, la résistance à l'insuline, le diabète de type 2, l'obésité, l'HTA et l'athérosclérose ont été rapportés.

Le modèle animal *Psammomys* est un modèle fréquemment utilisé pour l'étude du diabète car il contracte un diabète NID comparable à celui de l'humain (**Ben Djoudi O A, 2008**)

CHAPITRE II / MATERIEL ET METHODES

induit par un régime alimentaire hypercalorique. Son métabolisme développe **une insulino-résistance latente, une intensification de lipogenèse, et une leptinorésistance**. Il est également utilisé dans l'étude des ischémies cérébrales. Ce qui en fait un très bon modèle d'étude pour les dysfonctions vasculaires induites par le diabète de type 2.

La glycémie et l'insulinémie de *Psammomys obesus* sont sujettes à des variations saisonnières. La glycémie de *Psammomys* augmente en automne et au printemps alors que son pancréas produit plus d'insuline au printemps et en hiver. L'insuline plasmatique varie comme la glycémie sauf pendant l'été où un taux élevé d'insuline plasmatique est associée à une glycémie faible. Cette hyperinsulinémie saisonnière ne varie pas si on réduit la quantité de nourriture disponible pour l'animal.

Ce diabète d'origine "alimentaire" se retrouve chez des populations humaines qui sont passées d'un mode de vie où la nourriture était assez rare, ou peu énergétique, à un mode de vie "occidental" où les calories sont disponibles en abondance (comme c'est le cas dans les pays en voie de développement).

II.2. MISE EN ŒUVRE EXPERIMENTALE

II.2.1. CAPTURE DES ANIMAUX

La chasse commence à 8h du matin jusqu'à midi : les différentes étapes de la chasse sont résumées dans les photos du tableau I.



	
Inondation des terriers	Capture manuelle des rongeurs
	
Les rongeurs sont attrapés à la sortie des terriers	<i>Psammomys obesus</i> est récupéré dans des cages

Tableau I : Les différentes étapes de la chasse du *Psammomys obesus*

La capture des animaux consiste à inonder les terriers à partir du trou le plus élevé à l'aide d'un camion citerne. Les animaux sont saisis à la main gantée à la sortie des autres orifices.

Cette méthode est très rentable car nos rongeurs creusent leurs terriers sur des terrains argileux et que les galeries sont très profondes. On récupère les *Psammomys* dans des grandes cages où les plantes leurs sont données « ad libitum » jusqu'à leur arrivée à l'animalerie de l'USTHB.

II.2.2. CONDITIONNEMENT DE L'ANIMAL AU LABORATOIRE

Dès leur arrivée à l'animalerie, les animaux sont placés dans des cages individuelles en plastique équipées de :

- Une litière en sciure renouvelée trois fois par semaine.
- Une petite cage en bois (18cm×18cm×11cm) munie de deux ouvertures qui permettent à l'animal d'entrer et de sortir et de recréer les conditions naturelles de son terrier.
- Des morceaux de bois pour aiguiser ses incisives dont la croissance est trop rapide.

CHAPITRE II / MATERIEL ET METHODES

Dans l'animalerie la température est réglée 24 à 26°C et le degré hygrométrique 60 à 80%.

II.2.3. REPARTITION DES LOTS

Après 2 semaines qui caractérise la période d'adaptation ; les animaux sont divisés en 2 lots :

- **Lot A ou lot témoin** : Il comporte 10 *Psammomys* qui continuent à recevoir le régime naturel jusqu'au moment du sacrifice. La prise journalière de l'animal est de 50g/j ce qui correspond à 20-22 cal/j.
- **Lot B** : Il est constitué de 15 *Psammomys* soumis au régime hypercalorique sous forme de cookies pendant une période de 10 mois avec une prise journalière de 10g ce qui correspond à 32,5 cal/j ; parallèlement une solution de NaCl à 0,9% était mise à disposition.

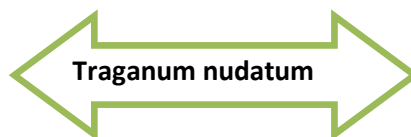
II.2.4. LES REGIMES ALIMENTAIRES

II.2.4.1. Les chénopodiacées

Le régime naturel de *Psammomys* est constitué de plantes halophiles de la famille des chénopodiacées de différentes espèces :

-*Traganum nudatum*, *Salsola foetidia* et *Suaedia mollis*.

Les photographies de la figure 11 montrent l'aspect du biotope de ces plantes



CHAPITRE II / MATERIEL ET METHODES

A leur arrivée au laboratoire, nous avons continué de nourrir les *Psammomys* de plantes halophiles de leur milieu pendant une semaine que nous avons remplacé progressivement par d'autres plantes de la même famille qui poussent en bordure de mer (Anse de Kouali à Tipaza).

II.2.4.2. Composition des régimes alimentaires

Le régime naturel est caractérisé par une teneur en eau de 80,8% et en sels de 6,9%. La valeur énergétique des plantes fraîches est estimée à 4,5 calories/g, avec une prise journalière de 50g/j ce qui correspond à 20-22 cal/j. Par contre, la valeur énergétique du régime de laboratoire est estimée à 3,25 cal/g de tout aliment.

Les tableaux suivants donnent la composition en nutriments du régime naturel, hypocalorique et de laboratoire, hypercalorique.

Tableau II : La composition centésimale du régime naturel.

Composition	Valeurs (%)
Eau	80.79
Matière minérale	6.86
Matière grasse	0.40
Matière protéique	3.53
Hydrate de carbone	8.42
Sucres totaux	0.18
Hémicellulose	2.62
Cellulose	2.23
Lignine	1.12
Indéterminé	2.27

Tableau III : La composition alimentaire pour 100g de ce régime hypercalorique.

Composition	Valeurs (%)
Eau	9
Matière minérale	7.1
Matière grasse	7.5
Matière protéique	25
Sucres totaux	47.4
Indéterminé	0
Cellulose	4
vitamine	

II.3. LES EXPERIMENTATIONS IN VITRO

Notre étude a porté sur 25 *psmmomys obesus* (mâles et femelles) dont le poids corporel varie entre 120 et 160g, capturés dans la région de M'Sila-Biskra. Avant toute expérimentation, les animaux sont soumis à une période d'acclimatation aux conditions de température et d'hygrométrie du laboratoire et ils reçoivent le régime alimentaire naturel pendant 2 semaines.

III.3.1. TECHNIQUES OPERATOIRES

II.3.1.1. Contrôle du poids corporel

Afin de contrôler l'évolution du poids corporel, les animaux sont pesés régulièrement de façon hebdomadaire.

III.3.1.2. Prélèvement des échantillons

- **Prélèvements sanguin pour les dosages plasmatiques**

Pour l'analyse des paramètres biochimiques, des prélèvements sanguins sont effectués mensuellement sur l'animal vigile par des ponctions au niveau du plexus rétro-orbital de l'œil, à l'aide d'une pipette pasteur préalablement héparinée. Le sang est prélevé sur des tubes héparinés pour l'évaluation des différents paramètres biochimiques (Glucose, Cholestérol, Triglycérides et insuline). Après centrifugation, les sérums et plasmas sont récupérés et conservés à -80°C afin de doser les différents paramètres.

- **Prélèvement des organes**

Pour l'étude de la rétinopathie diabétique, les globes oculaires de *psammomys* sont prélevés puis fixés dans le formol 10%, pour la réalisation des coupes histologiques. Après une durée de 9 mois et au terme de l'expérimentation, les animaux sont sacrifiés après anesthésie par une injection intra péritonéale d'uréthane 25%, à raison de 0,4 ml/100g de poids corporel.

II.3.2. TECHNIQUES ANALYTIQUES

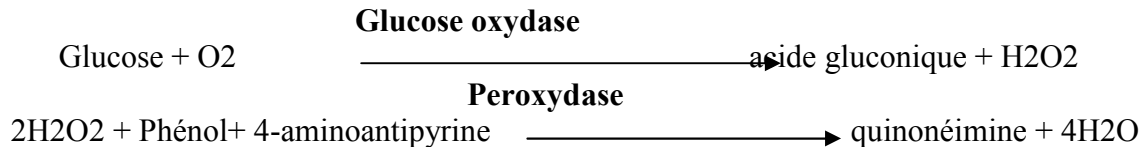
II.3.2.1. Dosages plasmatiques (Glucose, TG, cholestérol, insuline)

Afin de nous assurer que nos modèles animaux sont bien devenus diabétiques nous avons effectués les dosages plasmatiques du glucose, des triglycérides, du cholestérol ainsi que de l'insuline.

II.3.2.1.1. Principes des dosages

☞ Dosage du glucose

Le glucose sanguin est dosé par la méthode enzymatique à la glucose oxydase selon les réactions suivantes :



Le peroxyde d'hydrogène formé est proportionnel à la quantité de glucose, mesurable en spectrophotométrie à 500 nm.

- **Réactif** (Annexe II)

Réactif

Étalon

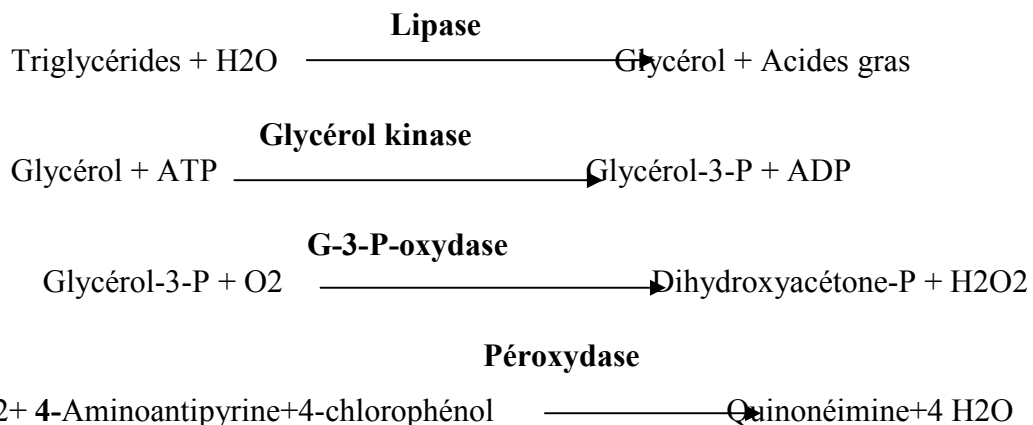
- **Solution réactionnelle**

Le réactif et l'étalon doivent être conservés à 2-8°C

Les réactifs préparés en solutions sont fournis prêts à l'emploi

☞ Dosage des triglycérides

Les triglycérides plasmatiques sont dosés par la méthode enzymatique à la lipoprotéine lipase selon les réactions suivantes :



L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en triglycérides dans le sérum.

- **Réactif** (annexe II)

Réactif

Etalon de triglycérides

- **Solution réactionnelle**

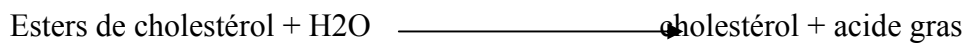
Le réactif et l'étalon doivent être conservés à 2-8°C

Réactif (A) et étalon (S) sont prêts à l'emploi

Dosage du cholestérol

Le principe du dosage du cholestérol total (estérifié+ libre) est enzymatique. Le cholestérol actuel dans l'échantillon lance un complexe coloré selon les réactions suivantes :

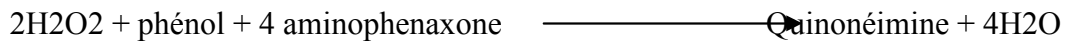
Cholestérol estérase



Cholesterol oxydase



Peroxydase



L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration du cholestérol total dans le sérum.

- **Réactif** (Annexe II)

(R1) amortisseur

(R2) enzymes

Cholestérol cal

- **Solution réactionnelle**

Le réactif et l'étalon doivent être conservés à 2-8°C

L'étalon est prêt à l'emploi

Réactif de travail : mélanger des volumes égaux de réactif R1 et R2 et bien agiter

✚ Dosage de l'insuline

Le dosage repose sur la compétition entre l'insuline marquée à l'iode 125 et l'insuline contenue dans les standards ou les échantillons à mesurer, vis-à-vis d'un nombre donné et limité de sites d'anticorps anti insuline fixés sur la phase solide des tubes. A la fin de la période d'incubation, l'excès de traceur est aisément éliminé par une étape de lavage.

La quantité d'insuline marquée liée à l'anticorps est inversement proportionnelle à la quantité d'insuline non marquée présente dans l'essai.

II.3.2.1.2. Modes opératoires

Dans des tubes à hémolyse jetable, on applique le protocole de dosage indiqué dans le tableau suivant :

Tubes	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif	—	—	—
Etalon	—	10 µl	—
Echantillon	—	—	10 µl
Réactif	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml

— Vide

Tableau IV : Protocole de dosage des solutions réactionnelles (dosage de glucose, TG, cholestérol)

- Agitation et incubation des tubes pendant 5 minutes à 37°C au bain marie (Annexe II)
- La lecture est effectuée au spectrophotomètre (Annexe III), à une longueur d'onde $\lambda = 500 \text{ nm}$:
 - Réglage du zéro de l'appareil avec de l'eau distillée
 - Lire l'absorbance (A) de l'étalon puis de l'échantillon

II.3.2.1.3. Méthodes de calcul

La concentration C de glucose dans le sérum est obtenue à partir de la relation suivante :

$$C \text{ glucose} = (A \text{ Echantillon} / A \text{ Etalon}) \times n$$

A = absorbance
 n = concentration de l'étalon
 n = 100mg/dl
n = 1 g/l
 n = 5,56 mmol

$$C \text{ tg ou cholestérol} = (A \text{ Echantillon} / A \text{ Etalon}) \times n$$

A= absorbance

n= concentration de l'étalon

n= 2g/l

II.2.3. Etude statistique

Le test utilisé dans le cadre de notre travail est le test de Student. Pour chaque série d'analyse, la moyenne et l'écart type sont calculés. Les paramètres statistiques sont donnés par les relations suivantes :

$$\text{Moyenne} = \frac{\sum ni xi}{N}$$

- ni : désigne la fréquence

- xi : est la valeur individuelle

- N : effectif

La variance δ^2 : est la moyenne des carrés des écarts types entre les valeurs de l'échantillon et la moyenne arithmétique.

$$\delta^2 = \frac{\sum ni (xi-xa)^2 + \sum ni (xi-xb)^2}{(Na-Nb)-2}$$

Ecart type $\sqrt{\delta^2}$

Erreur standard à la moyenne

$$\text{ESM} = \frac{\text{écart type}}{N-1}$$

N-1 : désigne le degré de liberté (ddl)

$$T = \frac{xa - xb}{\delta^2 / Na + \delta^2 / Nb}$$

Pour une ddl de (Na+Nb)-2 et à 5% d'erreur, la valeur de T nous donne le degré de signification P lu sur la table de Student, la différence entre deux moyenne est :

- Peu significative si $P < 0,05$ (*)

- Significative si $P < 0,01$ (**)
- Très significative si $P < 0,001$ (***)
- Très hautement significative si $P < 0,0001$ (****)

Cette analyse statistique a été appliquée aux poids corporels et aux paramètres biochimiques plasmatiques.

II.2.4. La technique histologique

(Martoja, 1967 ; Gabe, 1968 ; Reive, 1984)

II.2.4.1. Préparation des coupes histologiques

☛ Fixation

Les globes oculaires prélevés sont rapidement fixés au formol à 10% pendant 6 heures. Cette étape est importante car le formol permet le maintien de la morphologie tissulaire proche de celle à l'état vivant.

☛ La réception

Dès l'arrivée au laboratoire, chaque prélèvement doit être identifié puis enregistré sous un numéro de référence qui l'accompagne dans les différentes étapes de la technique.

☛ La circulation

Le but de cette technique est de durcir beaucoup plus le tissu, pour pouvoir confectionner des coupes histologiques minces d'environ $2\mu\text{m}$. Elle consiste à faire séjourner les pièces dans une série de liquides intermédiaires.

☛ La déshydratation

Elle consiste à placer les cassettes contenant le prélèvement dans un panier et leur faire subir 6 bains d'alcool (éthanol) à concentration croissante (de 75%-100%) pendant 12 h (2h pour chaque bain).

☛ L'éclaircissement

Consiste à remplacer l'alcool présent dans le tissu par un solvant de la paraffine qui est le xylène. Elle se fait pendant 8h, dans 4 bains de xylène (2h pour chaque bain).

☛ L'imprégnation

C'est la dernière étape de la circulation qui consiste à faire pénétrer la paraffine dans le tissu afin de le rendre plus rigide. Elle s'effectue à chaud dans 2 cuves en acier inoxydables et thermo-statées contenant de la paraffine liquéfiée. Les tissus sont tous portés dans des cassettes pérforées individuellement.

☛ L'inclusion et enrobage

Consiste à inclure les fragments dans des blocs de paraffine grâce à un appareil d'inclusion, selon les étapes suivantes :

- Préchauffage des moules et des cassettes dans une console thermique.
- Mise en place centrée du tissu dans le moule à moitié rempli de paraffine, à l'aide d'une pince.
- Refroidissement du bloc sur une plaque réfrigérante.
- Démontage et récupération des blocs.

Nous obtenons ensuite différents blocs de 3 types différents, des échantillons de globes oculaires murins normaux fœtaux et adultes ainsi que ceux atteints de rétinopathie diabétique.

☛ Confection des coupes

Les blocs sont débités au microtome de type *minot* en coupes fines d'environ 5 µm d'épaisseur.

☛ Sillanisation des lames

Nous préparons trois bacs dont le premier est une dilution à 7% de sillane (3-Aminopropyl ou triéthoxysillane) dans de l'acétone, le second de l'acétone pur et le troisième de l'eau distillée. Nous effectuons ensuite des rinçages consécutifs de 5 minutes chacun avant de laisser sécher nos lames.

☛ Etalement des coupes

Les rubans sont ramollis dans un bain marie à 37°C, puis recueillis sur des lames en verre à l'eau gélatinée à 0,4%, préalablement numérotées à l'aide d'un crayon diamant. Après séchage sur une plaque chauffante, les lames sont mises dans une étuve à 37°C, pendant 24 heures afin d'augmenter l'adhérence des coupes.

II.2.4.1. Coloration à l'Hématoxyline-Eosine (HE) pour l'observation des structures

☛ Principe

La méthode HE est une coloration de routine, utilisée pour tout fragment étudié dans le but d'obtenir une topographie générale de l'échantillon.

C'est une combinaison entre deux colorants, l'un basique hématoxyline qui colore le noyau (basophile) en bleu violacé et l'autre acide éosine qui confère une coloration rose au cytoplasme (acidophile).

☛ Mode opératoire

- Déparaffinage par passage de l'échantillon dans 3 bains de xylène d'environ 3 à 5 min chacun.
- Hydratation par passage dans 3 bains d'alcool de concentration décroissante (100°, 95°, 75°), pendant 2 min pour chaque bain. Dans le but de retirer le xylène et de le remplacer par de l'eau.
- Coloration à l'hématoxyline. Passage des coupes dans une solution de carbonates de lithium (Li₂CO₃). Coloration à l'éosine. Avec rinçage avant et après chaque étape.
- Déshydratation par passage dans l'éthanol à 95° puis 100° pendant 30 à 60 secondes.
- Eclaircissement par passage dans 2 bains de xylène de 30 à 60 secondes chacun.
- Montage sur lame à l'aide de milieu synthétique Eukitt.

Quel que soit les difficultés et les limites de l'HE, cet examen est réputé performant et fiable à environ 99%.

II.2.4.2. Immuno-Histochimie (VEGF et VE-cadhérine)

☛ Préparation des anticorps

Pour notre étude nous avons choisis 2 marqueurs angiogéniques principaux : le VEGF et la VE-cadhérine.

Nous avons inscrit le nom des marqueurs sur les tubes eppendorf dans lesquels nous avons effectués les dilutions dans un diluent spécifique à anticorps du kit de révélation en suivant le taux de dilution mentionné : VEGF (4%) et VE-cadhérine (2%). Temps de réaction 30 minutes pour chaque anticorps.

☛ Déparaffinage des lames

- 3 bains de Xylène de 5 minutes chacun

- Lavement dans des bains d'alcool benzylique à 100%, 96%, 70% pendant 5 minutes chacun
- Rinçage à l'eau distillée

☛ **Blocage des peroxydases endogènes**

- Incubation du tissu dans du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) pendant 5 minutes
- Rinçage à l'eau distillée

☛ **Démasquage antigénique**

- Immersion dans du tampon Tris-EDTA buffer, pH 9.0 (10x), target retrieval (réf. S2367), incuber à 97°C dans un bain-marie pendant 40 minutes
- Sortir la lame à la température ambiante et la laisser refroidir pendant 20 minutes

☛ **Marquage à l'anticorps primaire**

- Rinçage au PBS (Réf. S3024) pendant 5 minutes
- Appliquer l'anticorps primaire dilué, avec micropipette, en recouvrant le tissu entier, pendant 30 minutes
- Lavement 2 fois au PBS pendant 5 minutes

☛ **Marquage à l'anticorps secondaire**

- Appliquer l'anticorps secondaire HRP lapin/souris pendant 30 minutes
- Rinçage au PBS pendant 5 minutes

☛ **Révélation**

- 20µl du chromogène (x50)dilué dans 1 ml DAB (substrate buffer B) (Réf. 5007)
- Applique de 200 µl par lame
- Incubation pendant 5 minutes
- Rinçage à l'eau distillée

☛ **Contre-coloration** à l'Hématoxyline de Meyer

- Durée 2 minutes
- Rinçage à l'eau courante pendant quelques minutes

☞ **Post contre-coloration**

Quelques plongées dans l'eau ammoniaquée

☞ **Montage aqueux** sur lame et lamelle faramount (Aqueous Mounting medium Réf. S3025) pour l'observation

☞ **Examen microscopique :**

Les coupes sont observées et prises en photos par un appareil numérique de type *Canon Power Shot A610* adapté à un microscope photonique de type *Zeiss Axiostar plus*, les photos sont par la suite analysées et discutées afin d'en tirer les conclusions de notre étude.

☞ **Calcul du grossissement final :**

Le grossissement est calculé en prenant compte du grossissement de l'objectif et de l'indice du microscope selon la formule :

$$Gf = Go \times Im \times Fa$$

Gf = grossissement final ; Go = grossissement de l'objectif ; Im = indice du microscope ; Fa = facteur d'agrandissement de la photo par rapport à la taille du cadrant de la visualisation de l'appareil numérique.

CHAPITRE III :
RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. RESULTATS

III.1.1. RESULTATS METABOLIQUES

Les résultats analytiques sont réunis sous forme de tableaux et de graphiques, chaque tableau récapitulatif présentant la totalité des données individuelles est consigné dans les annexes. Les valeurs moyennes de chaque paramètre sont affectées de l'erreur standard à la moyenne (Test de Student). Ces derniers ainsi que les graphiques correspondants sont insérés dans le texte.

- Nous analyserons successivement les paramètres biochimiques plasmatiques chez le rat de sables témoin soumis au RN (plantes halophiles) pendant une durée de 9 mois.
- Nous comparerons ces mêmes paramètres biochimiques enregistrés au cours du syndrome diabétique chez le rat de sables soumis à un RHC pendant la même période.

III.1.1.1. Evolution du poids corporel des *psammomys* témoins et des *psammomys* soumis au RHC pendant 9 mois

Les rats de sables *psammomysobesus* soumis au RN pendant 9 mois présentent une évolution pondérale à faible amplitude avec une moyenne qui varie entre 68.80 ± 1.33 g et 97.30 ± 1.44 g en fin d'expérimentation. Contrairement aux *psammomysobesus* soumis au RHC pendant la même période qui développent au bout de 3 mois de régime une augmentation pondérale progressive et importante, allant de 77.40 ± 0.78 g à 121.33 ± 0.81 g en fin d'expérimentation (figure 15ci-dessous et tableau VII en annexe II).

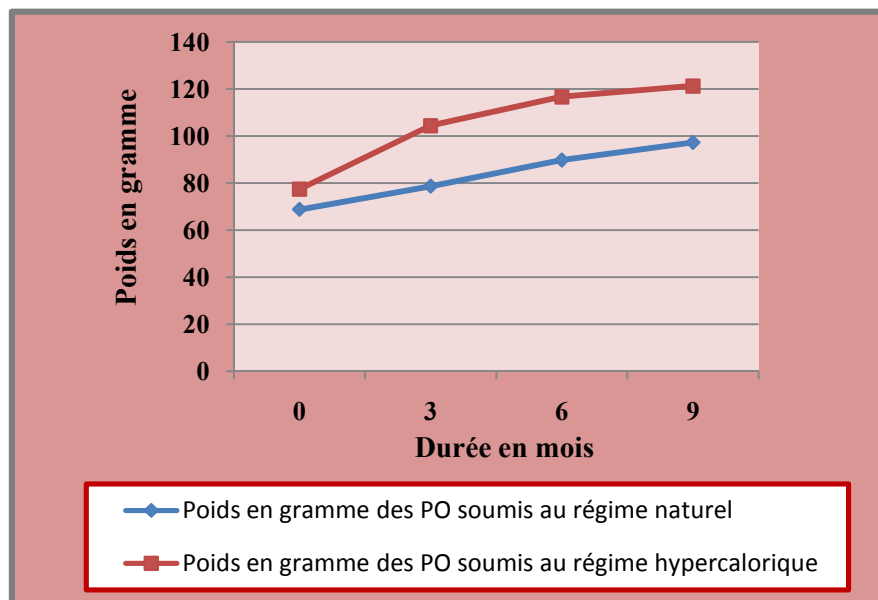


Figure 15 : Représentation graphique de l'évolution pondérale en g des *Psammomys obesus* témoins soumis au RN et des *Psammomys obesus* soumis au RHC pendant 9 mois.

CHAPITRE III/ RESULTATS ET DISCUSSION

III.1.1.2. Comparaison des paramètres biochimiques sériques entre les PO soumis au RN et les PO soumis au RHC

III.1.1.2.1. Glycémie

Sur le plan biochimique, la glycémie des rats des sables soumis au RN est de l'ordre de 64.70 ± 1.12 mg/100ml de plasma et ne subit pas de variations significatives pendant toute la durée du régime. En fin d'expérimentation elle arrive à une valeur de 73.10 ± 1.02 mg/100ml.

Contrairement aux rats soumis au RHC où les valeurs glycémiques subissent une augmentation importante dès le troisième mois du RHC pour la plupart des *Psammomys*, pour arriver à une moyenne de 201.33 mg/100ml à la fin de l'expérimentation (figure 16 ci-dessous et tableau VIII en annexe II).

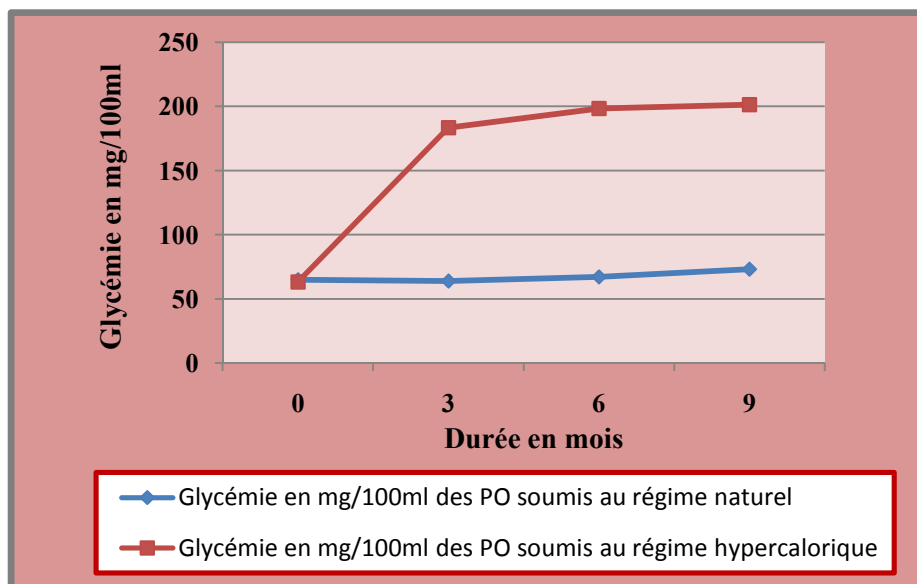


Figure 16 : Représentation graphique de l'évolution de la glycémie en mg/100ml des *Psammomys obesus* témoins soumis au RN et des *Psammomys obesus* soumis au RHC pendant 9 mois.

III.1.1.2.2. Triglycéridémie

Pour les PO témoins soumis au RN pendant 9 mois, les valeurs des triglycérides passent d'une moyenne de 67.70 mg/100ml pour arriver à une moyenne de 73.80 mg/100ml à la fin de l'expérimentation, soit une évolution de triglycéridémie peu importante.

Contrairement aux PO soumis au RHC où la triglycéridémie passe de 76.67 ± 0.95 mg/100ml au début de l'expérimentation pour atteindre une valeur de 243.53 ± 6.92 mg/100ml à la fin de l'expérimentation (figure 17 et tableau IX dans annexe II).

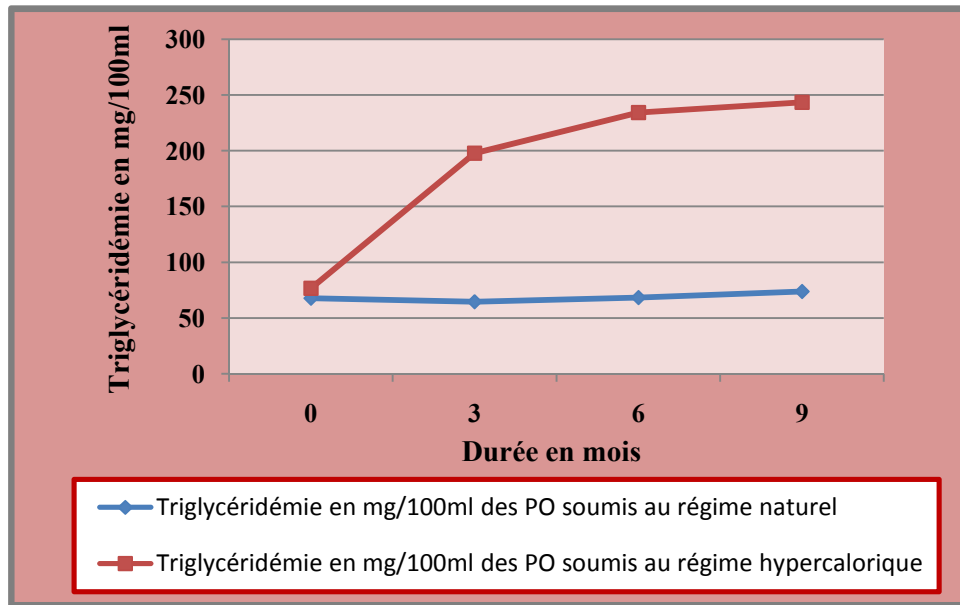


Figure 17 : Représentation graphique de l'évolution de la triglycéridémie des *psammomys obesus* témoins soumis au RN et des *psammomys obesus* soumis au RHC pendant 9 mois.

III.1.1.2.3. Cholestérolémie

Pour les PO témoins soumis au RN la cholestérolémie fluctue légèrement, la valeur passe de 54.90 ± 0.78 mg/100ml à 58.00 ± 1.10 mg/100ml de plasma.

Alors que pour les rats des sables soumis au RHC, le cholestérol total passe d'une moyenne de 52.60 mg/100ml à 137.20 mg/100ml après 9 mois de régime hypercalorique (figure 18 et tableau X dans annexe II).

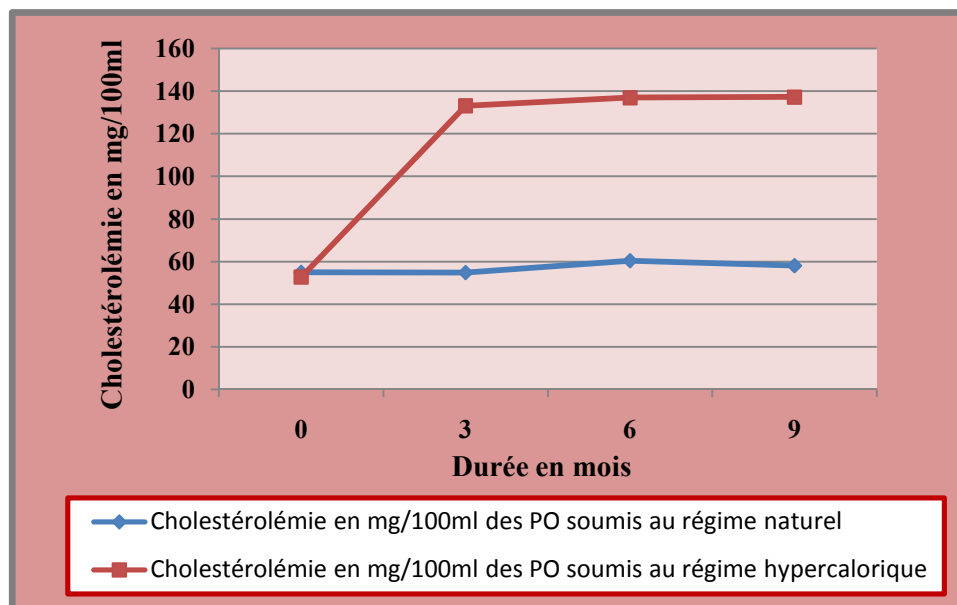


Figure 18 : Représentation graphique de l'évolution de la cholestérolémie en mg/100ml des *Psammomys obesus* témoins soumis au RN et des *Psammomys obesus* soumis au RHC pendant 9 mois.

III.1.1.2.4. Insulinémie

L'insuline immunoréactive plasmatique chez les animaux nourris aux plantes halophiles est de l'ordre de $26.20 \pm 0.48 \mu\text{UI/ml}$ de plasma. Une légère variation de ce paramètre est observée à la fin de l'expérimentation et l'on enregistre une valeur de $27.50 \pm 0.44 \mu\text{UI/ml}$ de plasma.

Par contre, chez les animaux nourris au régime standard de laboratoire, les taux de l'insuline plasmatique continuent d'augmenter et atteignent des valeurs jusqu'à $364.07 \pm 7.30 \mu\text{UI/ml}$ de plasma (tableau XI et figure 19).

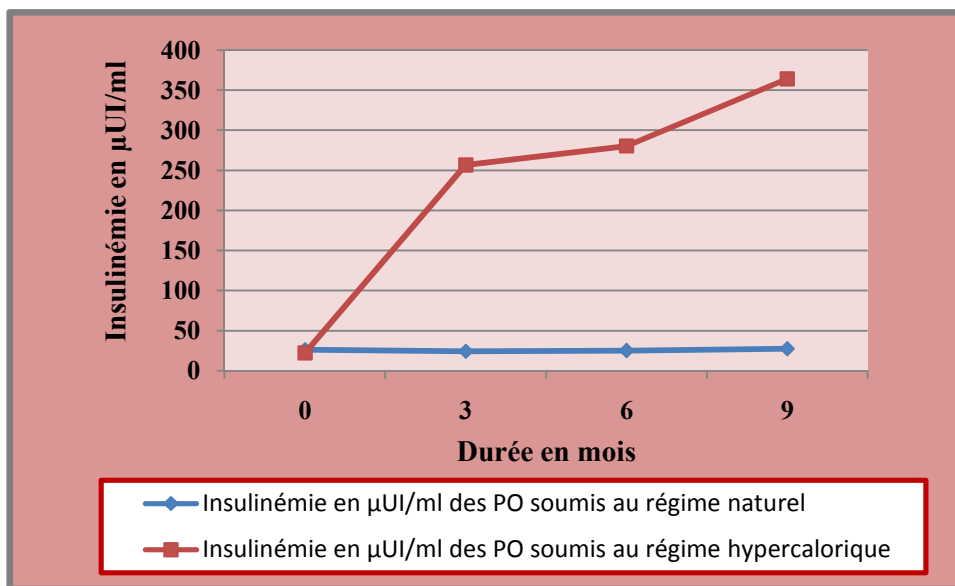


Figure 19 : Représentation graphique de l'évolution de l'insulinémie en $\mu\text{UI/ml}$ des *psammomys obesus* témoins soumis au RN et des *psammomys obesus* soumis au RHC pendant 9 mois.

III.1.2. Résultats de l'étude histologique

Nos gerbilles répondent à l'augmentation de l'énergie apportée par son alimentation provoquant une surcharge calorique par un accroissement de son poids corporel dû à une augmentation de la taille des adipocytes (augmentation des triglycérides et du cholestérol), une hyper insulinémie et une intolérance au glucose à différents degrés. On peut distinguer 4 stades successifs lors du développement de cette pathologie diabétique:

1 - Stade silencieux. Animaux présentant une glycémie et une insulinémie "normale" ($< 50 \mu\text{UI/ml}$). Pendant ce stade, l'insulinorésistance s'installe mais elle n'est pas décelable.

2 - Stade Hyper insulinémique ($< 250 \mu\text{UI/ml}$) ou l'insulinorésistance est installée: l'augmentation de la sécrétion insulinique compense encore la perte d'efficacité de cette molécule.

3 - Stade d'hyperinsulinémie s'accompagnant d'une hyperglycémie car l'insuline, même abondante, ne peut plus compenser l'élévation de la glycémie.

L'insulinorésistance est bien installée. A ce Stade, on peut encore revenir à la normale par une réduction drastique de l'apport calorique, en restaurant le régime alimentaire de base.

4 - Stade Hyperglycémique, les cellules β pancréatiques se suicident par apoptose dû au feed back négatif et ne peuvent plus produire d'insuline (insulinopénie): le taux de cette hormone s'effondre. L'apoptose des cellules β semble être causée par l'hyperglycémie. Ce fait a été confirmé par des études in vitro (**Donath & al., 1999**). Chez l'Homme c'est à ce stade que le patient atteint de diabète de type 2 devient insulinorequérant.

Nos résultats métaboliques montrent donc que notre modèle animal, à savoir le *Psammomys obesus*, peut développer un diabète de type 2 simplement en adoptant un régime alimentaire hypercalorique et on passe d'un animal sain à un modèle pathologique exemplaire reproduisant les mêmes étapes retrouvés chez l'humain et permettant une très bonne observation des différentes étapes relativement lentes d'évolution de la rétinopathie diabétique.

CHAPITRE III/ RESULTATS ET DISCUSSION

Après avoir rendu notre animal diabétique, fait dont attestent les résultats précédents, nous avons suivi l'évolution de la maladie diabétique sur la rétine par l'observation des différentes modifications structurales qu'elle a engendré.

Les figures suivantes présentent des photographies des coupes histologiques de la rétine colorées à l'hématoxyline éosine et sont observées à un grossissement total $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$, $\times 60$ et $\times 100$.

La planche I représente les coupes histologiques de la rétine de *Psammomys obesus* comparée à la rétine humaine.

La planche II représente les coupes histologiques de la rétine de *Psammomys obesus* fœtal HE (VEGF-/VE-cadhérine-), VEGF+.

La planche III représente les coupes histologiques de la rétine de *Psammomys* adulte sain HE (VEGF-/VE-cadhérine-), VEGF+, VE-cadhérine +.

Les planches IV et V représentent les coupes histologiques de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique HE (VEGF-/VE-cadhérine-), VEGF+, VE-cadhérine +.

Planche I

Coupe histologique de la rétine de *Psammomys obesus* et la rétine humaine

Figure 1 : Coupe histologique de la rétine humaine. Observation des différentes couches. Coloration à l'hématéine éosine ; G × 400. (D'après **Kahle W, 2007**).

Cette coupe histologique de la rétine humaine nous montre les différentes tuniques qui délimitent le globe oculaire. De l'extérieur vers l'intérieur nous trouvons :

La sclérotique (flèche blanche), tunique fibreuse.

La choroïde (flèche jaune), tunique moyenne très vascularisée.

La rétine (flèche bleue), tunique nerveuse constituée de dix couches successives :

Epithélium pigmentaire (1), constitué d'une seule couche de cellules fortement pigmentées et plaquées contre leur membrane basale, la lame de Bruch (**Ghaudieu G. et al., 2004**).

Couche des segments externes des photorécepteurs (2).

Membrane limitante externe (3).

Nucléaire externe (4), contient les corps cellulaires des cellules visuelles à cône et à bâtonnet.

Couche plexiforme externe (5), est la zone où se trouvent les contacts synaptiques entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires.

Nucléaire interne (6), contient les noyaux des cellules bipolaires.

Couche plexiforme interne (7), est la zone des synapses entre les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires.

Couche des cellules ganglionnaires (8), sont des neurones multipolaires.

Couche des fibres nerveuses (9), composée principalement par les axones des cellules ganglionnaires et les fibres des cellules de Müller.

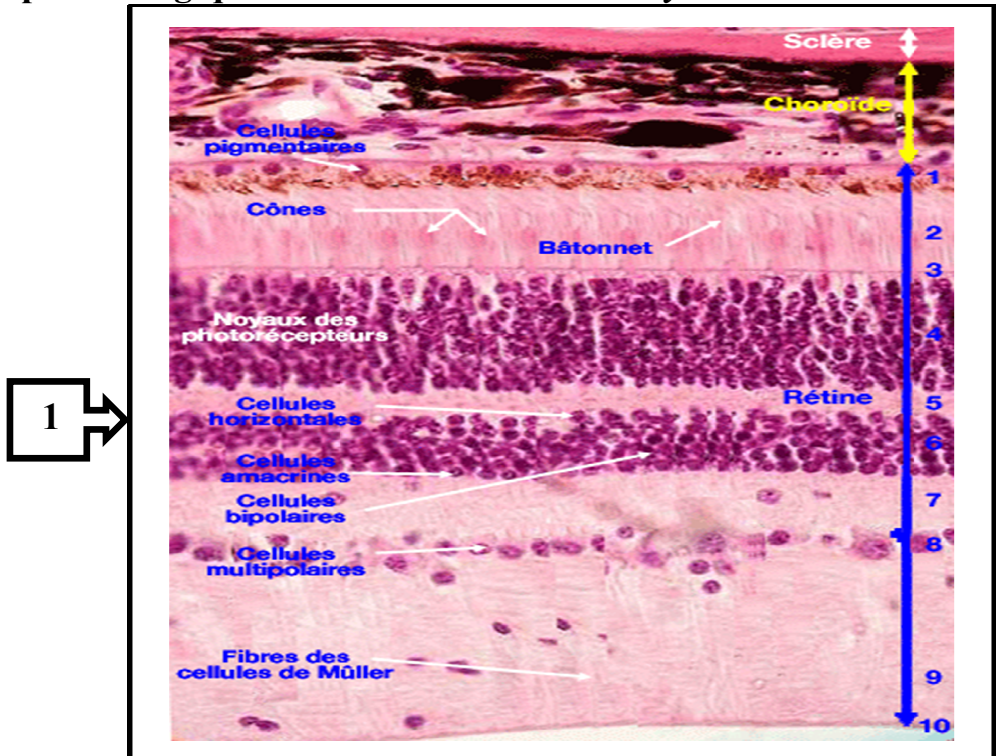
Membrane limitante interne (10), sépare la surface interne de la rétine du corps vitré.

Figure 2 : Coupe histologique de la rétine de *Psammomys obesus*. Coloration à l'hématéine éosine ; G × 400.

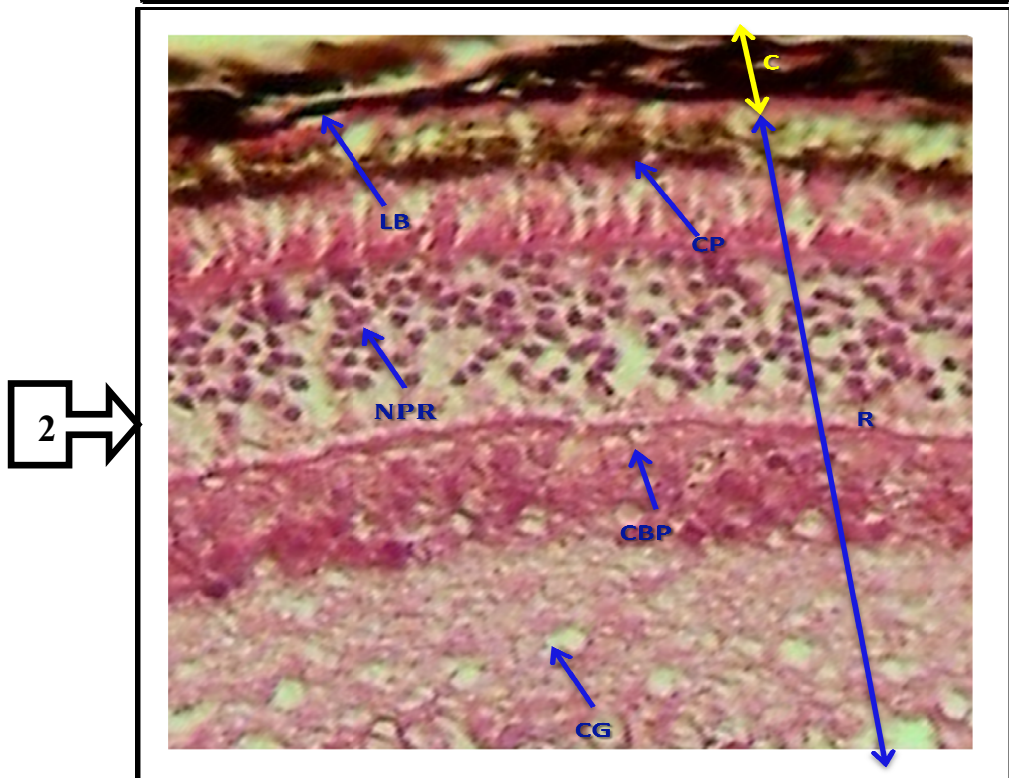
Cette coupe histologique donne une vue générale et met en évidence les trois tuniques : sclérotique (S), choroïde (C) et rétine (R). Elle montre également les différentes couches de la rétine et ces composantes : l'épithélium pigmentaire, constitué de cellules pigmentaires (CP) reposant sur la lame de Bruch (LB), les noyaux des photorécepteurs (NPR) constituant la nucléaire externe, les cellules bipolaires (CBP) formant la nucléaire interne et enfin les cellules ganglionnaires (CG) la couche la plus interne, est en contact avec le corps vitré (V).

Planche I

Coupe histologique de la rétine de *Psammomysobesus* et la rétine humaine



Coupe histologique chez l'humain
(littérature)



Coupe histologique chez *Po* (coloration
HE; Gx400)

Planche II

Coupes histologiques de la rétine de *Psammomys obesus* foetal

Figure a : Coupe histologique de la rétine de *Psammomys obesus* foetal. Marquage de la VEGF; G \times 400.

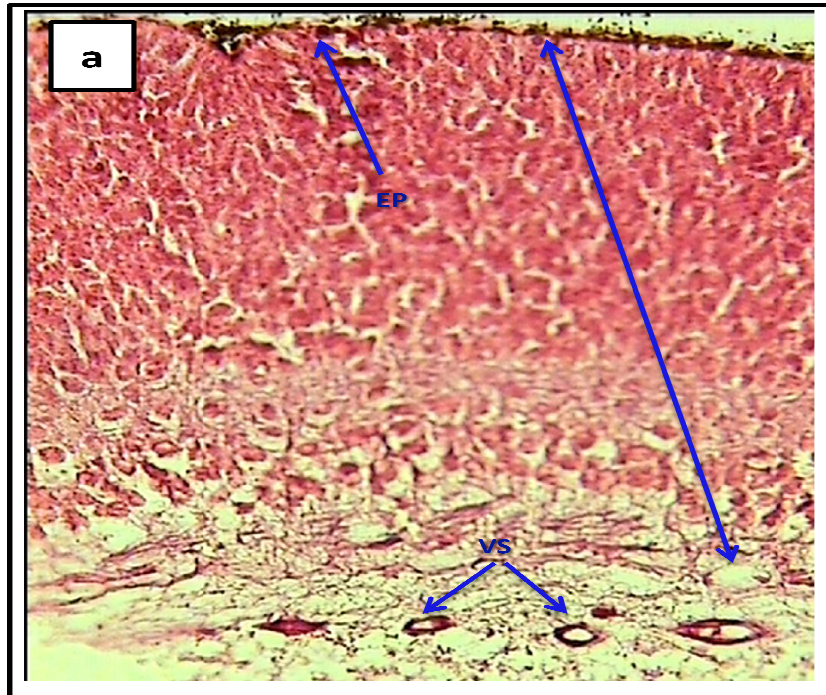
Figure b : Coupe histologique de la rétine de *Psammomys obesus* foetal. Coloration à l'hématéine éosine ; G \times 400.

Les coupes histologiques de la rétine foetale représentées sur les deux figures mettent en évidence le développement des micro-vaisseaux néoformés dans le processus de vasculogénèse. A ce stade du développement les différentes couches de la rétine neuro-sensorielle (flèche bleue) ne sont pas très distinctes et la différenciation des photorécepteurs n'est pas encore établie. On peut observer également un début de la vascularisation rétinienne où les vaisseaux sanguins (VS) sont en cours de division. Et le VEGF est très marqué suggérant le rôle clé de cette molécule au cours de la mise en place de la barrière hémato-rétinienne interne que représentent les vaisseaux (VS).

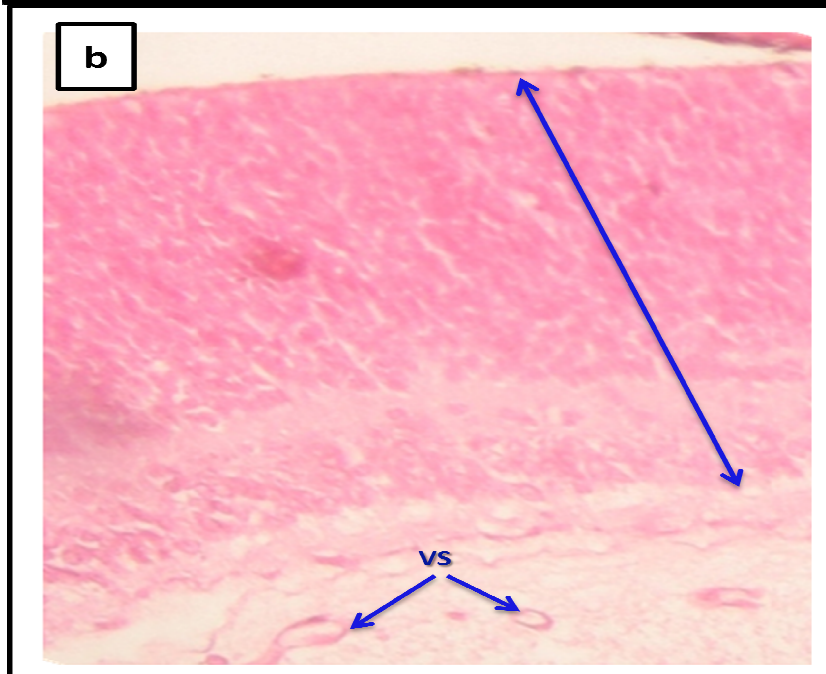
L'épithélium pigmentaire (EP) est formé bien avant la différenciation des autres couches de la rétine mais il n'a pas encore atteint sa maturation.

Planche II

Coupes histologiques de la rétine de *Psammomysobesus* foetal



Coupe histologique de la rétine de *Po* foetal (VEGF+;Gx400)



Coupe histologique de la rétine de *Po* foetal (HE;Gx400)

Planche III

Coupes histologiques de la rétine de *Psammomys obesus* témoin

Figure a : Coupe histologique de la rétine de *Psammomys obesus* témoin. Vue d'ensemble. Coloration à l'hématéine éosine ; G × 400.

Dans cette coupe histologique, le grossissement utilisé permet de visualiser l'ensemble des trois tuniques qui tapissent le globe oculaire :

La sclérotique (flèche blanche) : est la tunique la plus externe, de structure tendineuse, épaisse et très résistante qui donne sa forme à l'œil.

La choroïde (flèche jaune) : tunique moyenne, tapissée de cellules conjonctives très pigmentées, ce qui lui confère sa couleur caractéristique et contenant des vaisseaux sanguins (1) qui assure la nutrition de l'iris et des photorécepteurs rétiniens.

La rétine (flèche bleue) : est la tunique la plus interne, se compose de deux feuillets : l'épithélium pigmentaire (2) et la rétine neuro-sensorielle.

Figure b : Coupe histologique de la rétine de *Psammomys obesus* témoin. Observation des couches visuelles. Marquage au VEGF; G × 400.

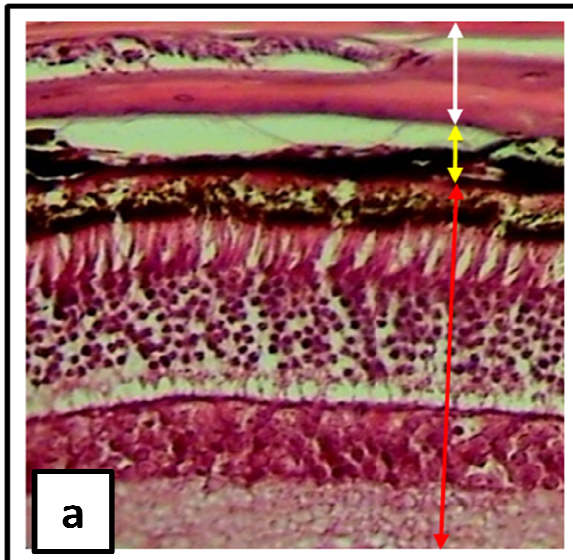
Dans cette coupe histologique on peut observer la stratification de la rétine en 4 couches principales. La couche la plus externe est l'épithélium pigmentaire qui apparaît sous forme d'une assise cellulaire très pigmentée, elles sont reliées par des jonctions serrées, ce qui constitue la BHR externe marquée au VEGF. Cette couche est en étroite relation avec une partie des articles externes des photorécepteurs les cônes et les bâtonnets. On observe une couche épaisse et fortement granulée.

Figure c : Coupe histologique de la rétine de *Psammomys obesus* témoin montrant la sclérotique. Coloration à l'hématéine éosine : G × 600.

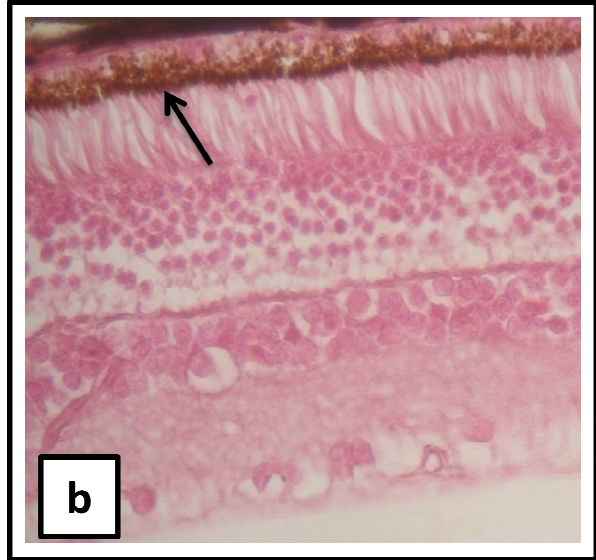
Cette coupe histologique permet de voir la couche scléreuse (flèche blanche) de l'œil qui est un tissu conjonctif fibreux, dense, peu vascularisé et formé essentiellement par des faisceaux de fibrilles de collagène (1) disposées en plans superposés entre lesquelles se trouvent les fibroblastes fusiformes (2). Au dessus de la sclérotique on observe une couche de cellules formant un épithélium prismatique stratifié, c'est la conjonctive (flèche noire).

Planche III

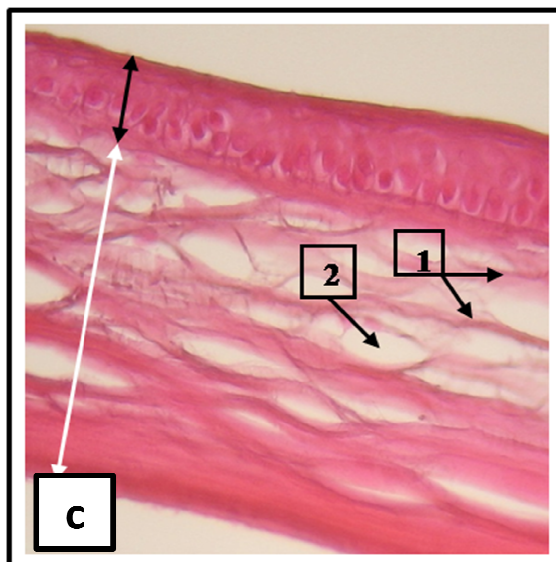
Coupes histologiques de la rétine de *Psammomys obesus* témoin



Coupe histologique des structures oculaires (HE; Gx400)



Coupe histologique des structures oculaires (VEGF; Gx400)



Coupe histologique de la sclère de *Po* (HE; Gx400)

Planche IV

Coupes histologiques de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique

Figure a : Coupe histologique de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique montrant une désorganisation de la neurorétine, marquage de VE-cadhérine; très faible témoignant de la perte probable des jonctions intercellulaires. Gx200

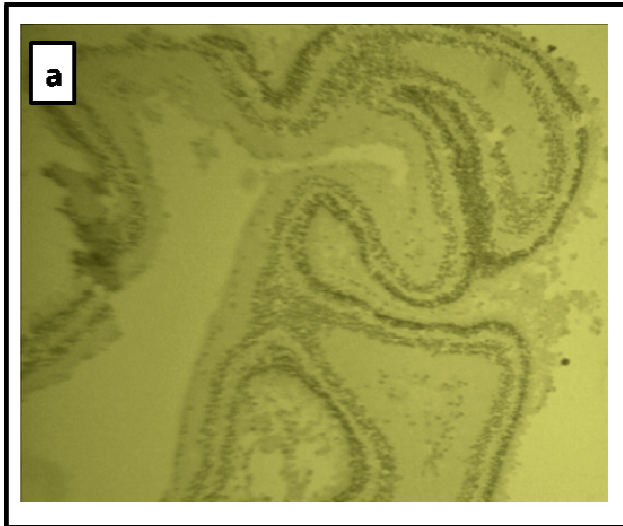
On observe ici une déstructuration sur l'ensemble de rétine due à la rupture de la BHR interne probablement causées par la perte de molécules de jonctions.

Figures b : Coupes histologiques montrant une néovascularisation proéminente se développant au dessus de la membrane limitante interne causant sa rupture.(c Gx50 ; d Gx400).

Figure c : Coupe histologique de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique mettant en évidence l'épaississement de BHR et décollement de la rétine. Coloration au VEGF. Gx200

Planche IV

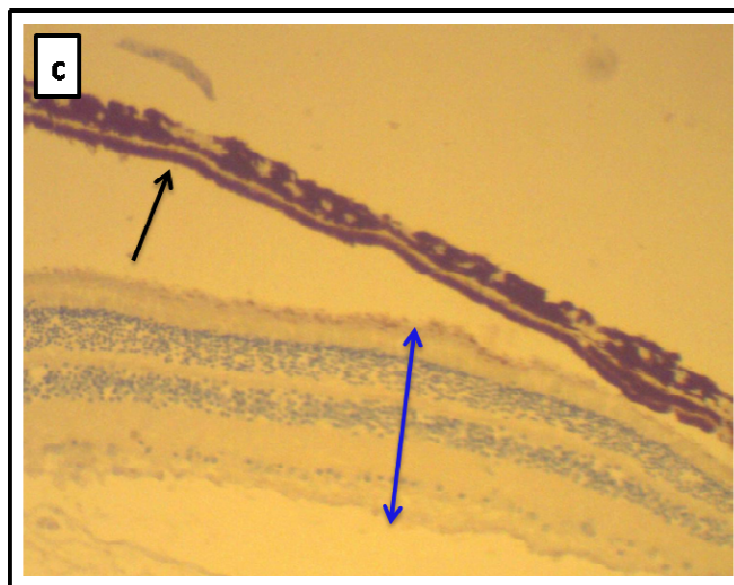
Coupes histologiques de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique



Coupe histologique de la rétine de *Po* (VE-cadhérine; Gx200)



Coupe histologique de la rétine avec néovascularisation proéminente (HE; Gx400)



Coupe histologique chez *Po* diabétique (VEGF; Gx400)

Planche V

Coupes histologiques de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique

Figure a : Coupe histologique de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique montrant une désorganisation de la neurorétine. Coloration à l'hématéine éosine ; G × 100.

On observe une altération de la morphologie de la neurorétine (flèche bleue) avec absence d'organisation des couches rétinienne consécutive à l'apoptose des cellules neuronales et l'altération des cellules gliales. Noter la présence d'obstruction d'un vaisseau sanguin (1) au niveau de la choroïde (2).

Figure b : Coupe histologique de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique. Vue d'ensemble. Marquage de la VE-cadhérine; G × 100.

Cette coupe histologique montre une désorganisation complète de la rétine neurosensorielle (flèche bleue) dont les différentes couches sont difficiles à distinguer. Les articles externes : la choroïde (flèche rouge), l'épithélium pigmentaire (1), et les couches des grains ne sont plus discernables. La VE-cadhérine est faiblement exprimée.

Figure c : Coupe histologique de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique montrant une dystrophie choroïdienne. Marquage au VEGF ; G × 1000.

La structure de la choroïde (flèche rouge) apparaît complètement altérée et déstructurée et se présente par détachement des différentes strates sous forme de lanières (1) avec de multiples hémorragies (2) situées entre ces dernières et une intensité de marquage au VEGF surexprimé à ce stade (prolifératif).

Figure d : Coupe histologique de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique montrant une altération de la sclérotique. Coloration à l'hématéine éosine ; G × 1000.

Cette coupe histologique permet de voir une altération de la conjonctive (flèche rouge) avec présence de cellules rondes possédant un cytoplasme vacuolisé (1) ainsi qu'une forte dissociation des faisceaux des fibres collagènes (2) au niveau de la sclérotique (flèche blanche).

Planche V

Coupes histologiques de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique

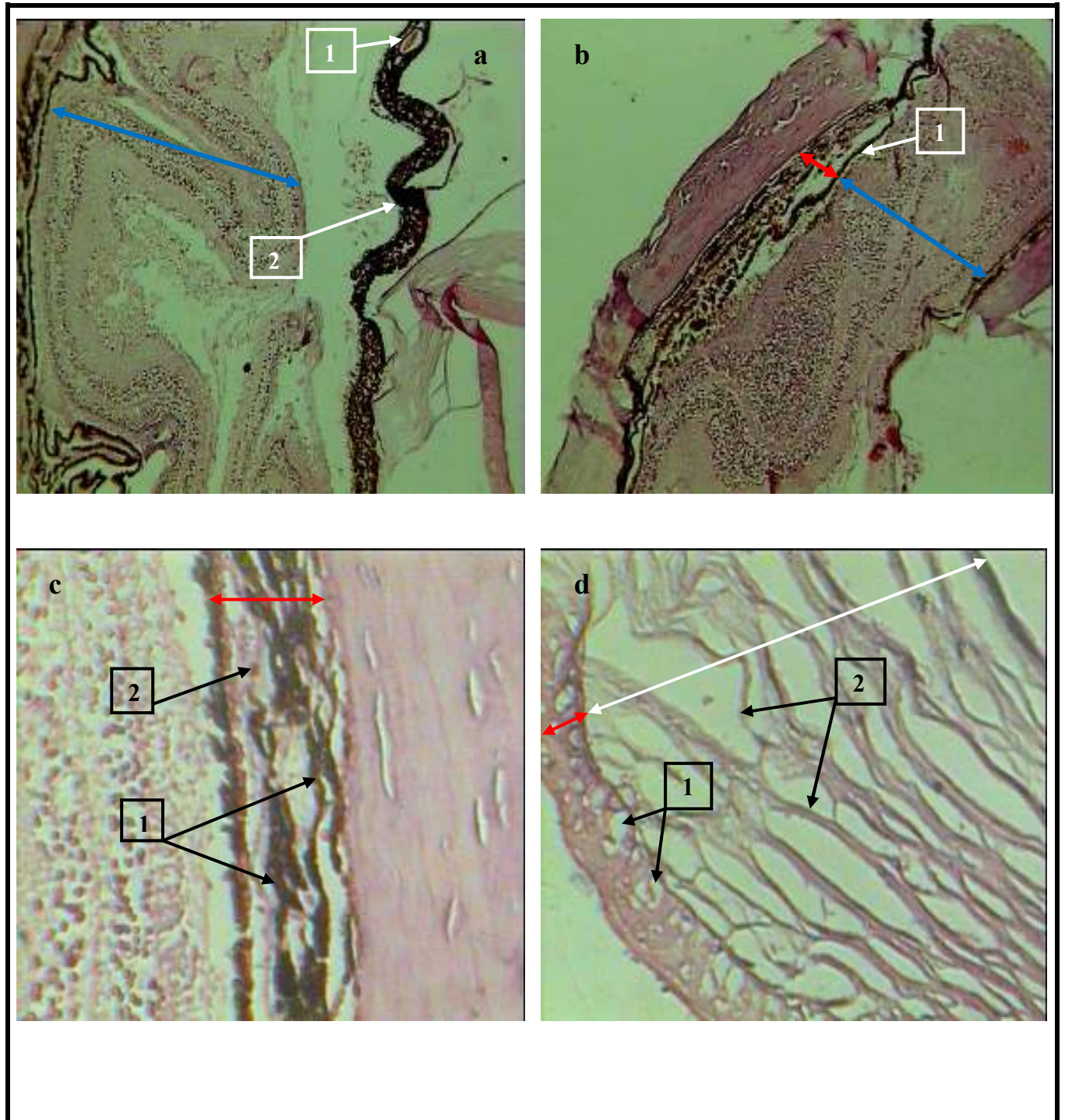


Planche VI

Coupes histologiques de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique

Figure a : Coupe histologique de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique montrant une obstruction des vaisseaux choroïdiens. Marquage au VEGF; G × 1000.

Le grossissement utilisé permet de bien mettre en évidence une occlusion d'un vaisseau sanguin (1) au niveau de la choroïde (flèche rouge) ainsi qu'une désorganisation complète de la neurorétine (flèche bleue) et un marquage accru au niveau de la BHR interne.

Figure b : Coupe histologique de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique montrant un microanévrisme intrarétinien. Coloration à l'hématéine éosine ; G × 600.

Cette coupe met en évidence un microanévrisme d'un capillaire rétinien (1) qui apparaît sous forme sacculaire avec hypercellularité de la paroi du capillaire dont la lumière est complètement occluse. On observe également un détachement de l'épithélium pigmentaire (2) dont les jonctions serrées s'ouvrent aboutissant à la rupture de la BHR externe. Les noyaux des couches des grains (3) sont de densité diminuée. Notant aussi la présence d'hémorragies choroïdiennes (4).

Figure c : Coupe histologique de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique montrant un microanévrisme capillaire. Coloration à l'hématéine éosine ; G × 1000.

Cette coupe au fort grossissement permet de mieux visualiser la structure d'un microanévrisme capillaire (1) qui s'est développé à partir d'une dilatation de la paroi capillaire (2) constituant la BHR interne. Cette paroi est épaissie à cause de la prolifération accrue des cellules endothéliales (3) après dégénérescence des péricytes. Notant aussi l'absence de lumière qui est complètement obstruée.

Figure d : Coupe histologique de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique montrant des hémorragies choroïdiennes. Marquage au VEGF; G × 1000.

On observe des hémorragies (1) au niveau de la choroïde avec diffusion de sérum dans l'espace choroïdien ainsi qu'un décollement rétinien (flèche jaune) consistant à la séparation de la neurorétine et l'épithélium pigmentaire (2) qui apparaît décheté suite à la rupture de ses jonctions intercellulaires. Une importante altération de la sclérotique et également observée avec dissociation des faisceaux des fibres collagènes (3).

Figure e : Coupe histologique de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique montrant un décollement rétinien. Coloration à l'hématéine éosine ; G × 1000.

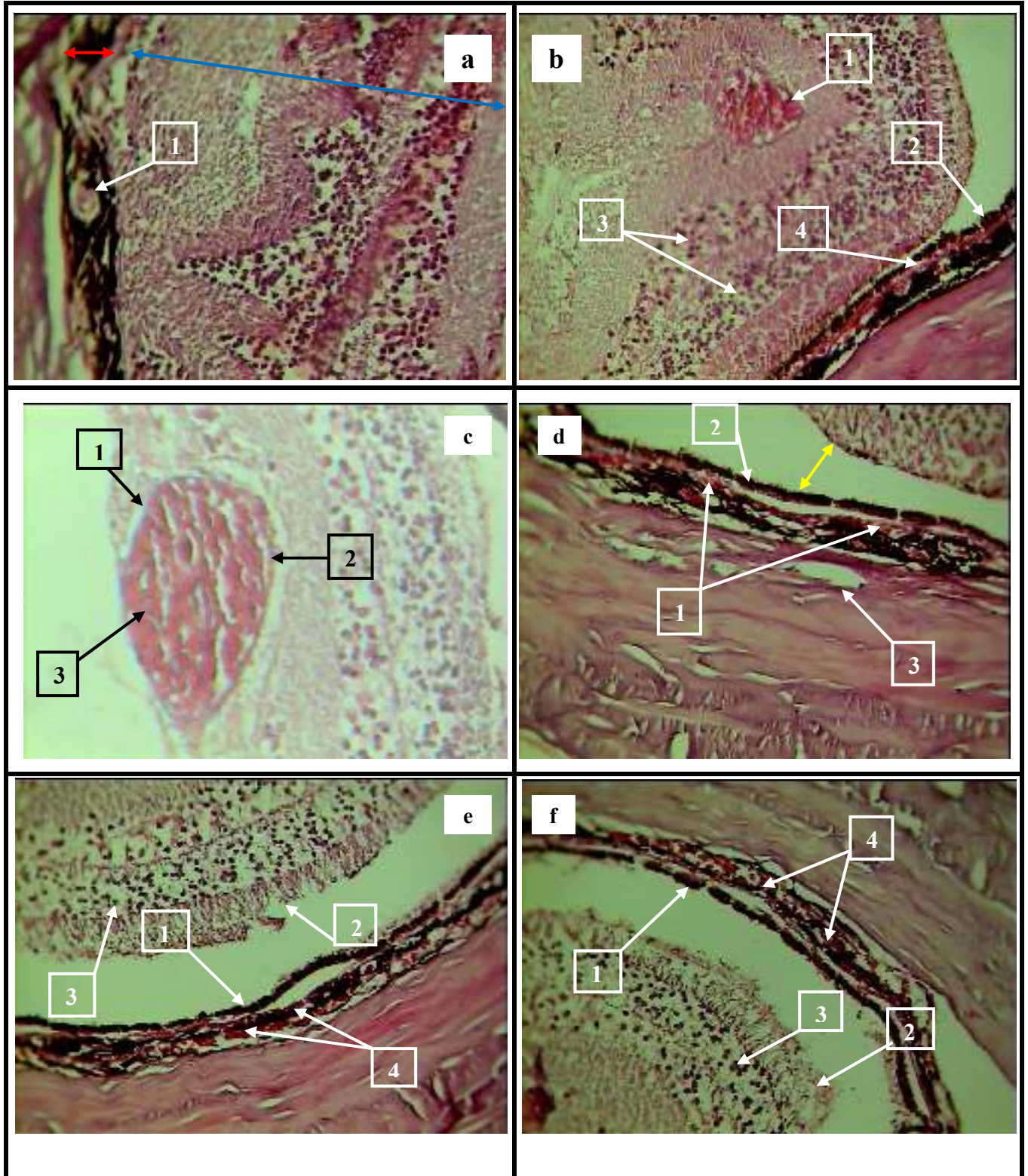
CHAPITRE III/ RESULTATS ET DISCUSSION

Figure f : Coupe histologique de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique montrant un décollement rétinien. Maquage de la VE-cadhérine; G × 1000.

Ces deux coupes montrent un stade très avancé de la rétinopathie diabétique et le marquage de la VE-cadhérine est quasiment absent. La neurorétine est complètement séparée de l'épithélium pigmentaire (1) avec dégénérescence et disparition des segments externes des photorécepteurs (2). Les noyaux des couches granulaires (3) de densité diminuée témoignant l'apoptose des cellules neuronales rétiniennes. Des hémorragies choroïdiennes (4) sont observées avec altération et déstructuration complète de la choroïde.

Planche VI

Coupes histologiques de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique



III.2. DISCUSSION

Les résultats métaboliques ont montrés que durant leur captivité au laboratoire, les *Psammomysobesus* nourris au régime de leur biotope naturel sont normoglycémique et ne contractent pas de diabète.

Après une variation du régime alimentaire avec un régime hypercalorique, des changements surviennent dans les dosages plasmatiques ; nos modèles deviennent insulino-résistants et les taux de LDL et de triglycérides se voient à la hausse.

Fait est de constater que le degré des lésions structurales observées au niveau du tissu rétinien est liée à la sévérité de l'hyperglycémie et donc à la durée du régime alimentaire hypercalorique de nos animaux.

Les résultats histologiques viennent étayer ces changements par l'observation d'altérations structurales et fonctionnelles regroupés sous le nom de microangiopathies. Exactement de la même façon qu'observés chez l'Humain. La structure de la rétine étant semblable à celle de l'Homme, elle permettrait une comparaison plus fiable.

Nos observations montrent un épaissement des microvaisseaux, microanévrismes et la dégénérescence des cellules endothéliales avec pour conséquence une dilatation et une occlusion des capillaires rétiniens et l'apparition de microanévrismes comme il a été observé dans d'autres études (**Guagnigni A.P et Snyers B., 2007**).

La gravité des lésions microvasculaires induites par la toxicité chronique du glucose diffère selon le tissu cible. Elle est excessive dans certains organes particulièrement sensibles comme la rétine. Et la présence du VEGF sécrété excessivement contraste avec celle de la VE-cadhérine qui semble être exprimée progressivement au cours de l'embryogenèse, stable au niveau de la rétine d'un adulte sain, tandis qu'elle est sécrétée à un taux bas voire quasi absente au niveau de rétine hypoxique des *Po* diabétiques, particulièrement au stade prolifératif.

La VE-cadhérine est la principale composante des jonctions adhérentes inter-endothéliales. Comme nous l'avons vu précédemment, ces structures jonctionnelles sont au centre de la régulation de toutes les autres jonctions de l'endothélium vasculaire. En effet, elle est impliquée dans le contrôle de la perméabilité et de l'intégrité vasculaire, l'angiogenèse,

CHAPITRE III/ RESULTATS ET DISCUSSION

l'extravasation des leucocytes et vraisemblablement dans celle des cellules tumorales (**Byrne et al., 2005; Hermant, 2006; Wallez et al., 2006b**).

Or comme pour l'invasion tumorale, on observe une migration des cellules endothéliales pour la formation de nouveaux vaisseaux au cours de l'évolution de la RD. Et de même les vaisseaux néoformés sont désorganisés, structurellement et fonctionnellement défailants.

La nature des partenaires protéiques de la VE-cadhérine qui composent le complexe jonctionnel est encore sujette à controverse. Jusqu'à présent, il était admis que les jonctions adhérentes sont des complexes protéiques simples dans lesquels la VE-cadhérine est associée directement à la β - ou la γ - caténine et à p120, la connexion au cytosquelette d'actine se faisant par l'intermédiaire de l' α - caténine, elle-même fixée sur la β - ou la γ -caténine (**Dejana, 2004; Gumbiner, 2005; Lampugnani et al., 1995**). Dans l'endothélium vasculaire adulte, ou dans un tapis de cellules endothéliales confluentes, les jonctions adhérentes matures sont considérées comme quiescentes, et c'est donc une vue conventionnelle et figée de la jonction qui a prévalu jusqu'à récemment (**Gates and Peifer, 2005**).

La corrélation entre la surexpression du VEGF et la néovascularisation rétinienne consolide son rôle autant que facteur stimulant l'angiogenèse. Et la désorganisation au stade terminal d'évolution de la pathologie dans les cas les plus graves montre une expression très faible, voire quasi absente de la VE-cadhérine

Des études dans d'autres tissus ont stipulé que l'hypoxie active certains facteurs de transcription appelés "facteurs inductibles par l'hypoxie" (ou HIF). C'est le cas de HIF α qui se dissocie de HSP90 (protéine de choc thermique), se transloque dans le noyau et active des gènes cibles dont les enzymes glycolytiques, l'érythropoïétine, le VEGF et ses récepteurs [65]. Plusieurs arguments vont dans le sens d'une induction tissu spécifique (**Frelin C. et al., 2000**).

L'action du VEGF sur la prolifération cellulaire est limitée par la présence même de la VE-cadhérine, liée à la β -caténine, ce qui, entre autre, expliquerait le faible pouvoir d'induction de la prolifération des cellules endothéliales confluentes par le VEGF (**Grazia, Lampugnani et al., 2003**). En effet, en l'absence de VE-cadhérine ou de β -caténine, les cellules endothéliales perdent toute inhibition de contact et répondent à la stimulation par le VEGF. Un autre mécanisme de régulation de la prolifération endothéliale, interférant avec la signalisation provoquée par le VEGFR2 a été proposé. Il s'avère que le VEGF, lorsqu'il

CHAPITRE III/ RESULTATS ET DISCUSSION

s'associe à son récepteur, induit son internalisation. Le VEGFR2, bien que dans des vésicules à clathrine, garderait sa capacité à transmettre le signal d'induction de la prolifération en gardant sa capacité à interagir avec les autres protéines cellulaires (**Lampugnani et al., 2006**). Son association avec la VE-cadhérine retardant l'internalisation du VEGFR2, il ne pourrait plus transmettre son signal à partir des vésicules à clathrine, ce qui par conséquent limiterait la prolifération cellulaire.

Le contraste observé entre la surexpression du VEGF et la déficience en VE-cadhérine à la surface des cellules endothéliales constituant la BHR interne pourrait être expliqué par une internalisation de la VE-cadhérine suite à l'expression du VEGF qui met en place une signalisation intracellulaire faisant intervenir la Rho-GTPase Rac qui conduit à la phosphorylation sur le résidu sérine S665 de la VE-cadhérine et au recrutement de la β -arrestine-2. S'en suit une endocytose de cette cadhérine dans des vésicules recouvertes de clathrines. La stimulation du VEGFR2 par la fixation de son ligand, ce qui fait détruit physiquement et localement les jonctions endothéliales et promeut la perméabilité paracellulaire, et qui suivent le tri vésiculaire jusqu'à un compartiment de type endosome mature non lysosomal, et la cascade de signalisation en aval du VEGF impliquée dans l'endocytose de la VE-cadhérine serait une voie requise dans l'augmentation de la perméabilité endothéliale induite par le VEGF, suggérant fortement que les deux événements sont corrélés (**Gavard and Gutkind, 2006**). Et que l'internalisation de la VE-cadhérine augmenterait la réponse au VEGF. Ce qui expliquerait l'hyperperméabilité des capillaires malgré leur épaisseur.

Le VEGF n'induit pas seulement la prolifération cellulaire, il apparaît impliqué dans la transmission de signaux anti-apoptotiques par la voie Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3 kinase)/Akt. Après stimulation des cellules par le VEGF, le VEGFR2 s'associe à la VE-cadhérine par le biais de la β -caténine (**Carmeliet et al., 1999; Grazia Lampugnani et al., 2003; Lambeng et al., 2005**). La rétine ischémique enverrait le VEGF comme signal de survie.

Des cellules endothéliales immortalisées dérivées de cellules souches embryonnaires murines dépourvues de VE-cadhérine fonctionnelle sont incapables de transmettre le signal de survie induit par le VEGF, bien qu'elles expriment normalement ses récepteurs, et présentent donc un taux d'apoptose bien supérieur à celui des cellules sauvages (**Carmeliet et al., 1999**).

Ceci suggère que la VE-cadhérine, sous l'influence du VEGF, engendre un signal antiapoptotique par son association au VEGFR2, ce qui serait appuyé par le contraste observé dans notre marquage.

CHAPITRE III/ RESULTATS ET DISCUSSION

Dans les cas de rétinopathie diabétique comme pour les tumeurs solides, le VEGF est surexprimé et la néo-angiogenèse qui en résulte produit **des vaisseaux tortueux, dilatés, perméables, anormaux tant sur le plan structural que fonctionnel (Jain, 2005)**, c'est ce que nous observant au niveau des microvaisseaux rétiniens chez *Psammomysobesus*.

Les propriétés de la barrière hémato-rétinienne, constituée des trois types cellulaires (cellules endothéliales, péricytes et cellules de Müller), est affectée. Le passage trans-cellulaire de solutés et de protéines plasmatiques serait en effet augmenté par un accroissement de l'endocytose des cellules endothéliales (Gardiner *et al.*, 1995) et de la

transcytose de constituants plasmatiques (Stitt *et al.*, 2000a et b) confirmés par notre étude. L'augmentation du transport trans-endothélial semble impliquer les cavéoles, microdomaines membranaires capables de s'invaginer et de former des vacuoles intracellulaires (Stitt *et al.*, 2000a). Ce processus d'internalisation a été décrit comme stimulé par le facteur de perméabilité VPF (vascular permeability factor)/VEGF (Feng *et al.*, 1999), augmenté dans la rétine de patients diabétiques au cours de la phase précoce de la maladie (Mathew *et al.*, 1997), on observe une **hyper-perméabilité des barrières hémato-rétiniennes**. D'autre part, le passage para-cellulaire de solutés serait également modifié, du fait d'une altération de la morphologie et de la perméabilité des jonctions serrées. Parmi les différents composants protéiques, l'occludine et ZO-1 et ZO-2 représentent des protéines essentielles dans la fonction de la BHR. La VE-cadhérine étant indispensable pour la formation même des jonctions serrées responsables de l'étanchéité des barrières.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nos résultats métaboliques ont montrées qu'un régime hypercalorique administré à notre modèle animal suffirait à lui seul à déclencher un diabète de type 2, une mauvaise qualité de graisses et un taux de sucre trop élevés étant la première cause d'apparition de troubles cardio-vasculaires et dans notre cas de microangiopathies.

L'hyperglycémie chronique et les différents mécanismes de la toxicité du glucose qui lui sont associés participent activement aux altérations cellulaires et tissulaires développés chez les diabétiques et il apparaît clairement que notre modèle animal *Psammomys obesus* est un excellent modèle pour l'étude du diabète de type 2 et ses complications puisqu'il reproduit ces mêmes altérations observés cliniquement chez l'Homme.

Nos résultats histologiques mettent en évidence une perturbation progressive de la structure des couches de la neuro-rétine ainsi que des barrières hémato-rétiniennes renforcés par un écart entre l'expression excessive du VEGF et celle de la VE-cadhérine de plus en plus faible, particulièrement aux stades de rétinopathie diabétique proliférative.

Les produits de la glycation non-enzymatique des protéines modifieraient leurs actions, et induiraient des mécanismes de survie envoyés par la rétine hypoxique, dont la sécrétion du VEGF.

En réponse à ce facteur, l'angiogenèse induite conduit à des troubles rhéologiques et hémodynamiques confirmés dans notre modèle. De plus, elle induirait la formation de vaisseaux tortueux, épais mais perméables, structurellement et fonctionnellement de mauvaise qualité.

Cette réponse de survie, conduirait finalement à un nombre trop élevé de néovaisseaux qui ne répondent pas au besoin initial représenté par l'apport d'oxygène et de nutriments. Les troubles hémodynamiques et rhéologiques semblent une résultante des effets de l'hyperglycémie toxique, où les AGE accentuent les autres voies biochimiques proposés dans la pathogenèse de la RD.

Dans notre étude nous nous sommes concentrés sur deux éléments majeurs, mais la complexité des molécules interagissant à tous les niveaux fait qu'il serait intéressant de connaître les autres partenaires moléculaires activés par les AGE intervenant dans l'apparition des modifications observées dans l'étude histologique.

Le cytosquelette et l'importance particulière du cytosquelette d'actine a pris de l'ampleur ces dernières années et il est désormais admis que la dynamique du cytosquelette d'actine contribue largement à la maturation des jonctions adhérentes (**Waschke et al., 2005**). Connaître les perturbations que subit ce réseau dans le cadre d'une hyperglycémie chronique entravant le fonctionnement correcte de l'endothélium vasculaire et la migration lors de l'angiogenèse serait une piste probable vers une meilleure compréhension des phénomènes observés.

Cette étude ouvre la perspective vers une étude thérapeutique et le développement de nouveaux traitements de l'angiogenèse oculaire. Le réseau vasculaire désorganisé, nous rappelant celui d'une tumeur au stade métastatique nous fait penser à l'étude de la

Combretastatine A-4, une molécule extraite d'une plante africaine *Combretum caffrum*, et qui est une excellente thérapie angiostatique agissant spécifiquement sur les cellules endothéliales enclenchés par la tumeur, peut-être en serait-il de même pour la RD ? Mais il serait à craindre des conséquences encore plus néfastes d'une réponse du VEGF suite à la destruction des vaisseaux, et une autre molécule associée à la Combretastatine A-4 inhibant le VEGF serait intéressante à développer parallèlement. Jusqu'ici, les thérapies d'inhibition du VEGF ne se sont dirigées que vers des anti-corps monoclonaux anti-VEGF. L'orientation vers l'inhibition de la lacthadérine, sans laquelle le VEGF n'induirait pas de néovaisseaux au niveau d'ischémie du membre inférieur et capable seule de déclencher la néovascularisation (Silvestre et al., 2005), serait intéressant à étudier dans le cadre d'une ischémie rétinienne.

GLOSSAIRE

Acidocétose : Trouble métabolique sévère et l'une des complications aiguës du diabète correspondant à une acidité excessive du sang conséquence de l'accumulation de corps cétoniques.

Anévrisme ou anévrysme : Poche résultant de la dilatation d'un vaisseau sanguin liée à la faiblesse de la paroi vasculaire, susceptible de se rompre, ce qui peut être à l'origine d'une hémorragie interne parfois fatale.

Athérome (du gr. *athêrôma*, « loupe de matière graisseuse ») ou **athérosclérose** : correspond à un remaniement de l'intima des artères de gros et moyen calibre (aorte et ses branches, artères coronaires, artères cérébrales, artères des membres inférieurs) par accumulation segmentaire de lipides, glucides complexes, sang et produits sanguins, tissus adipeux, dépôts calcaires et autres minéraux.

Apoptose : Processus actif d'autodestruction naturellement programmé et organisé, par fragmentation aboutissant à la phagocytose de la cellule.

Cécité : Perte complète de la vision.

Compliance : Aptitude d'une cavité organique à changer de volume sous l'influence d'une variation de pression.

Coronaires : Artères vascularisant le myocarde ou muscle cardiaque.

Dyslipidémie : Est un terme désignant une modification du taux normal des lipides sanguins. Elle désigne en pratique courante une concentration trop élevée d'un ou des types de lipides présents dans le sang.

Exsudat : Liquide organique séreux, fibrineux ou muqueux, qui suinte au niveau d'une partie enflammée.

Fibrinolyse : Comme son nom l'indique, est le processus par lequel la fibrine est détruite (lyse). La fibrinolyse est indispensable pour éliminer la fibrine (protéine filamenteuse qui intervient dans le phénomène de la coagulation). En effet, si la fibrine était présente en trop grande quantité, elle pourrait entraîner la formation d'un caillot dans la circulation, avec des risques de thrombose veineuse (phlébite) ou artérielle (ischémie) que cela suppose.

Macroanévrisme : Anévrisme survenant au niveau des gros vaisseaux

Microanévrisme : Anévrisme survenant au niveau des petits vaisseaux

Œdème : Gonflement survenant dans les tissus sous-cutanés par suite d'infiltration de sérosités dans le milieu interstitiel.

Hémodynamique : Etude des lois qui règlent l'écoulement et le débit du sang dans l'organisme.

Hypoxie : Diminution de la quantité d'oxygène distribuée par le sang aux tissus.

Ischémie : (à partir des élém. formants *isch-* du gr. « arrêter, retenir » et *-émie* « sang » littéralement « qui arrête le sang »), Arrêt ou insuffisance de la circulation sanguine artérielle dans une partie du corps ou un organe, qui prive les cellules d'apport d'oxygène et entraîne leur nécrose.

Lipoprotéines : Association moléculaire formée par des lipides et des protéines, permettant aux lipides (triglycérides et cholestérol) peu solubles dans l'eau de circuler dans le sang.

Radicaux libres : Sont des molécules d'oxygène instables et incomplètes qui endommagent de manière irréversible les principaux constituants des cellules de l'organisme.

Rhéologie : Etude du comportement de la matière qui s'écoule en fonction de sa plasticité, de son élasticité et de sa viscosité, lorsqu'elle est soumise à des déformations, des contraintes et des pressions.

REFERENCES

Aberle, H., S. Butz, J. Stappert, H. Weissig, R. Kemler, and H. Hoschuetzky. 1994. Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J Cell Sci.* 107 (Pt 12):3655-63.

Ahrens, T., M. Lambert, O. Pertz, T. Sasaki, T. Schulthess, R.M. Mege, R. Timpl, and J. Engel. 2003. Homoassociation of VE-cadherin follows a mechanism common to "classical" cadherins. *J Mol Biol.* 325:733-42.

Al-Amoudi, A., J. Dubochet, and L. Norlen. 2005. Nanostructure of the epidermal extracellular space as observed by cryo-electron microscopy of vitreous sections of human skin. *J Invest Dermatol.* 124:764-77.

Al-Kurdi, R., D. Gulino-Debrac, L. Martel, J.F. Legrand, A. Renault, E. Hewat, and C. Venien-Bryan. 2004. A soluble VE-cadherin fragment forms 2D arrays of dimers upon binding to a lipid monolayer. *J Mol Biol.* 337:881-92.

Amanchy, R., D.E. Kalume, and A. Pandey. 2005. Stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC) for studying dynamics of protein abundance and posttranslational modifications. *Sci STKE.* 2005:pl2.

Amano, M., M. Ito, K. Kimura, Y. Fukata, K. Chihara, T. Nakano, Y. Matsuura, and K. Kaibuchi. 1996. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem.* 271:20246-9.

Amieva, M.R., and H. Furthmayr. 1995. Subcellular localization of moesin in dynamic filopodia, retraction fibers, and other structures involved in substrate exploration, attachment, and cell-cell contacts. *Exp Cell Res.* 219:180-96.

Anastasiadis, P.Z. 2007. p120-ctn: A nexus for contextual signaling via Rho GTPases. *Biochim Biophys Acta.* 1773:34-46.

Angelini, D.J., S.W. Hyun, D.N. Grigoryev, P. Garg, P. Gong, I.S. Singh, A. Passaniti, J.D. Hasday, and S.E. Goldblum. 2006. TNF-alpha increases tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin and opens the paracellular pathway through fyn activation in human lung endothelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 291:L1232-45.

Babiychuk, E.B., and A. Draeger. 2000. Annexins in cell membrane dynamics. Ca(2+)-regulated association of lipid microdomains. *J Cell Biol.* 150:1113-24.

Brownlee M. Biochemistry and molecular cellular biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414: 813-20.

Chen, X., S. Kojima, G.G. Borisy, and K.J. Green. 2003. p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions. *J*

Cell Biol. 163:547-57.

Chu, Y.S., W.A. Thomas, O. Eder, F. Pincet, E. Perez, J.P. Thiery, and S. Dufour. 2004. Force measurements in E-cadherin-mediated cell doublets reveal rapid adhesion strengthened by actin cytoskeleton remodeling through Rac and Cdc42. *J Cell Biol.* 167:1183-94.

Comunale, F., M. Causeret, C. Favard, J. Cau, N. Taulet, S. Charrasse, and C. Gauthier-Rouviere. 2007. Rac1 and RhoA GTPases have antagonistic functions during Ncadherin-dependent cell-cell contact formation in C2C12 myoblasts. *Biol Cell.* 99:503-17.

Corada, M., M. Mariotti, G. Thurston, K. Smith, R. Kunkel, M. Brockhaus, M.G. Lampugnani, I. Martin-Padura, A. Stoppacciaro, L. Ruco, D.M. McDonald, P.A. Ward, and E. Dejana. 1999. Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:9815-20

UKPDS Group (UKPDS 69). Les risques de progression de la rétinopathie et de la perte de la vue en rapport avec le contrôle de la pression sanguine de type étanche dans deux diabètes sucrés. *Arc Ophtalmol* 2004; 122:1631-1640.

Coue, M., S.L. Brenner, I. Spector, and E.D. Korn. 1987. Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Lett.* 213:316-8.

Cullere, X., S.K. Shaw, L. Andersson, J. Hirahashi, F.W. Lusinskas, and T.N. Mayadas. 2005. Regulation of vascular endothelial barrier function by Epac, a cAMP-activated exchange factor for Rap GTPase. *Blood.* 105:1950-5.

Daly, R.J. 2004. Cortactin signalling and dynamic actin networks. *Biochem J.* 382:13-25.

Wautier JL, Zoukourian C, Chappey O, Wautier MP, Guillausseau PJ, Cao R, Hori O, Stern D, Schmidt AM. Receptor mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy: soluble receptor for advanced glycation end-products blocks hypermeability. *J Clin Invest* 1996 ; 96 : 238-43.

Klein R, Klein B, Moss S, *et al.* L'étude épidémiologique Wisconsin de la rétinopathie diabétique. III prévalence et du risque de rétinopathie diabétique lorsque l'âge au moment du diagnostic est de 30 ans ou plus. *Arc Ophtalmol* 1984; 102: 527-532.

Guillausseau PJ, Massin P, Charles MA, *et al.* contrôle et le développement de la rétinopathie de diabète de type 2 glycémique: une étude longitudinale. *Diabetic Medicine* 1998; 15:151-155.

Microangiopathie diabétique (233c), Corpus médical, *Professeur Pierre-Yves BENHAMOU*, Novembre 2002 (Mise à jour Février 2005).

G. RENARD, C. LEMASSON, M. SARAUX et al., *Anatomie et histologie de l'œil, ibid.*, 2^e éd., 1982.

Thomas, S.R., K. Chen, and J.F. Keaney, Jr., *Oxidative stress and endothelial nitric oxide bioactivity*. *Antioxid Redox Signal*, 2003. **5** (2): p. 181-94.

Wautier JL, Guillausseau PJ. Diabetes, advanced glycation end-products and vascular disease. *Vascular Med* 1998; 3: 131-7

Wautier JL, Guillausseau PJ. Advanced glycation end-products and their receptors and diabetic angiopathy. *Diabetes Metab* 2001; 27: 535-4

MP, Massin P, Guillausseau PJ, Huijberts M, Levy BI, Boulanger E, Laloi-Michelin M, Wautier JL. N(carboxymethyl)lysine as a biomarker for microvascular complications in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab* 2003; 29: 44-51.

Wautier MP, Boulanger E, Guillausseau PJ., Massin P, Wautier JL. AGEs, macrophage colony stimulating factor and vascular adhesion molecule blood levels are increased in patients with diabetes microangiopathy. *Thromb Haemostasis* 2004; 91: 879-85.

Corvera, S., C. DiBonaventura, and H.S. Shpetner. 2000. Cell confluence-dependent remodeling of endothelial membranes mediated by cholesterol. *J Biol Chem*. 275:31414-21.

Wautier JL, Wautier MP, Schmidt AM, Anderson GM, Ori O, Zoukourian C, Capron L, Chappey O, Yaw SD, Brett J, Guillausseau PJ, Stern D. Advanced glycation endproducts (AGES) on the surface of diabetic red cells bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: a link between surface-associated AGES and diabetic complications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 : 91 : 7742-7746

Wassmann, S., K. Wassmann, and G. Nickenig, *Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells*. *Hypertension*, 2004. **44** (4): p. 381-6.

ANNEXES

ANNEXE I

*La définition du diabète repose en fait sur plusieurs études épidémiologiques prospectives qui ont montré de façon convergente que lorsque la glycémie à la deuxième heure de l'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO) est supérieure ou égale à 2 g/l, il existe un risque de survenue, dans les 10 à 15 ans suivants, d'une rétinopathie diabétique.

Les prévisions pour 2030 sont alarmantes faisant du diabète le fléau du XXIème siècle. Les campagnes de prévention sont donc de plus en plus nombreuses pour éviter d'arriver aux chiffres prévus par des experts (source: Le Monde, 11/05/2007):

- Proche-Orient: + 164%
- Afrique: + 162%
- Asie du Sud-Est: + 161%
- Inde: + 150%
- Amérique latine: + 148%
- Chine: + 104%
- Amérique du Nord: + 72%
- Europe: + 32%

D'après les estimations, 1,1 million de personnes sont mortes du diabète en 2005. Près de 80 % des décès dus au diabète se produisent dans les pays à revenu faible ou moyen, et près de la moitié des décès attribuables au diabète surviennent chez des personnes de moins de 70 ans et 55 % des personnes qui en meurent sont des femmes. L'OMS prévoit que les décès dus au diabète vont augmenter de plus de 50 % au cours des dix prochaines années si l'on ne prend pas des mesures urgentes.



Estimation de la prévalence du diabète dans le monde d'ici 2030 (d'après l'U.K.P.D.S)

Vasorelaxants	Vasoconstrictants
NO	Angiotensine II
Prostacycline	ET-1
EDRF	Thromboxane
Bradikinine	Prostaglandine
Peptide natriurétique	Peroxyde d'hydrogène
Adrénomoduline	Radicaux libres

Tableau 1. Liste des agents vaso-actifs sécrétés par l'endothélium*

❖ Jonctions serrées

L'expression de JAM B est limitée à quelques sous-populations endothéliales, comme les veinules endothéliales hautes ou les cellules lymphatiques. JAM A, quant à elle, est exprimée par les plaquettes, les cellules endothéliales et épithéliales.

. Les JAM peuvent contracter des interactions homophiliques, participant donc à l'adhérence des cellules endothéliales. Elles peuvent cependant établir des interactions hétérophiliques en s'associant avec des intégrines, telles LFA-1 pour JAM A ou Mac-1 pour JAM B. Ces

interactions laissent à penser que non seulement les JAM participent aux jonctions serrées, mais sont également impliquées dans les contacts entre cellules endothéliales et leucocytes qui ont lieu lors de la transmigration leucocytaire.

Lee et coll. ont émis l'hypothèse que la formation des jonctions serrées résulterait de la fusion des membranes de deux cellules adjacentes (**Lee et al., 2004**). Ces auteurs rapportent que dans les cellules épithéliales rénales canines (MDCK, Madin-Darby Canine Kidney) à confluence, les protéines des jonctions serrées, ZO-1, occudine et claudine sont co-localisées au niveau des jonctions intercellulaires avec l'annexine 2, une protéine capable d'induire la fusion des membranes (**Lambert et al., 1997**). C'est précisément cette propriété et sa présence au niveau des contacts intercellulaires qui a permis à cette équipe d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'annexine 2 serait impliquée dans la formation des jonctions serrées en établissant un pont symétrique entre les deux feuillettes externes de cellules adjacentes (**Lee et al., 2004**).

❖ Les autres systèmes d'adhérence

En plus des quatre types de jonctions citées précédemment, il existe d'autres complexes d'adhérence dans l'endothélium vasculaire. Elles sont elles aussi constituées de protéines transmembranaires, associées à des protéines cytosoliques, qui interagissent avec les composantes des autres structures. L'existence d'une interaction ainsi qu'une régulation réciproque entre toutes ces structures adhésives est envisageable.

1. Le système nectine/afadine

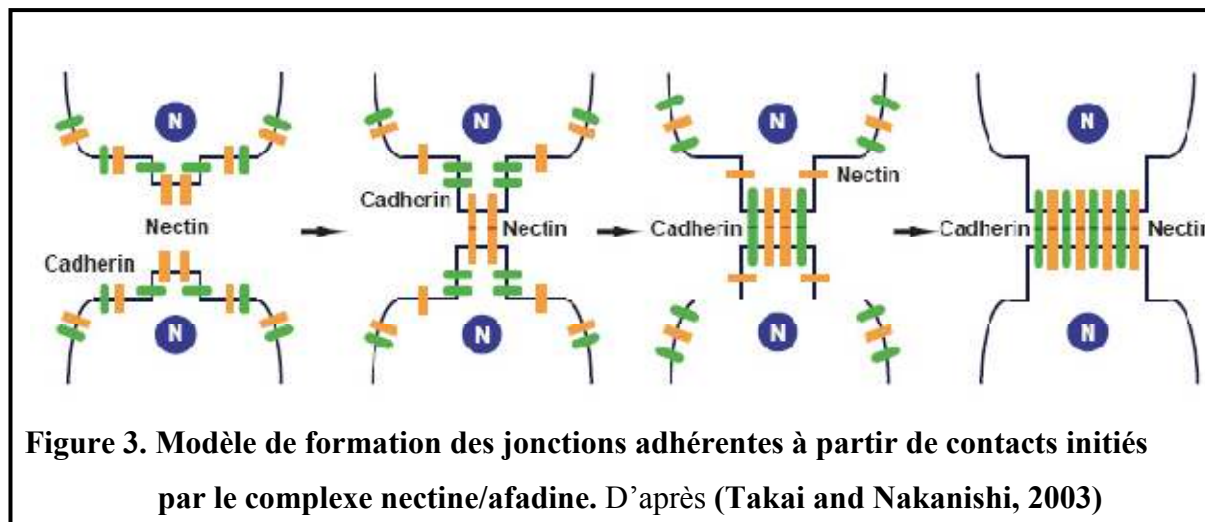
Le complexe jonctionnel nectine/afadine a été très peu étudié dans les endothélia. Ce qui est rapporté dans ce paragraphe a été essentiellement acquis par l'étude biochimique de systèmes chimériques, acellulaires ou épithéliaux.

La protéine nectine est une molécule d'adhérence cellulaire apparentée aux Ig (ICAM, Ig like-Cell Adhesion Molecule), dont la partie extracellulaire possède trois domaines Ig (**Takai and Nakanishi, 2003**). Le reste de la molécule comprend un domaine transmembranaire et une partie cytoplasmique capable de lier l'afadine, son ligand intracellulaire. La famille compte quatre membres, nommés nectines et numérotés de 1 à 4. A l'exception de la nectine-4, chaque protéine possède deux ou trois variants issus d'épissages alternatifs. Chaque

membre de la famille est capable de former des homodimères, mais pas d'hétérodimères, sur une même cellule, en *cis*. Les nectines 3 et 4 peuvent s'associer en hétérodimères *trans* avec les nectines portées par les cellules adjacentes (**Lopez et al., 1998**).

Le couple nectine/afadine est assimilé à une composante des jonctions adhérentes, pourtant, cette vision restrictive semble erronée puisque le couple nectine/afadine serait également impliqué dans la formation des jonctions serrées (**Takai and Nakanishi, 2003**).

Dans les jonctions adhérentes épithéliales, les complexes nectine/afadine sont physiquement et fonctionnellement associés au complexe formé par la cadhérine épithéliale (E-cadhérine) et les caténines. La E-cadhérine est recrutée au niveau des contacts intercellulaires formés par les nectines, ce qui suggère une coopération entre les deux systèmes pour initier la formation de jonctions adhérentes. Les contacts intercellulaires induits par le système nectine/afadine pourraient donc être un prérequis à l'initiation de la formation des jonctions adhérentes et serrées plus élaborées. Aux tous premiers stades d'un contact entre deux cellules, les protrusions membranaires présentent à leur surface la E-cadhérine, l'occludine, la claudine, les JAM et la nectine. Les protéines en *trans* se rencontreraient et formeraient des homodimères. Les nectines ayant une cinétique de dimérisation plus rapide que les autres protéines, elles élaboreraient donc les contacts initiaux, permettant ainsi le rapprochement des membranes et la formation des autres jonctions. La nectine-2 est à même de recruter l' α -caténine ainsi que ZO-1, indépendamment l'une de l'autre, permettant sans doute l'initiation des jonctions serrées et/ou adhérentes (**Yokoyama et al., 2001**). En outre, le recrutement de JAM A au niveau des jonctions serrées pourrait requérir la présence des jonctions à base de nectine au préalable (**Fukuhara et al., 2002**). Les nectines et les E-cadhérines formeraient des « micro-agrégats », qui s'associeraient le long de la membrane, pour étendre les jonctions à toute la zone de contact intercellulaire (**figure 3**) (**Takai and Nakanishi, 2003**). On ne peut cependant pas pour autant exclure que ces interactions initiales engendrent une signalisation intracellulaire permettant également la mise en place et la maturation des autres jonctions. L'afadine, par l'intermédiaire de la ponsine, est capable d'interagir avec les filaments d'actine, contrairement à la s-afadin, sa forme additionnelle issue d'un épissage alternatif (**Dejana, 2004; Takai and Nakanishi, 2003**). L'afadine ne peut cependant pas se lier aux extrémités des filaments d'actine, ce qui suggère qu'elle établirait spécifiquement une liaison avec le réseau cortical d'actine plutôt qu'avec les fibres de stress.



2. Le système PECAM-1/ β -caténine/SHP2

PECAM-1 est une protéine de 130 kDa qui appartient à la superfamille des Ig. Elle s'exprime très précocement durant le développement embryonnaire, et se maintient jusqu'à l'âge adulte dans toutes les cellules endothéliales (**Ilan and Madri, 2003**). Son expression est restreinte aux cellules du système vasculaire, ainsi qu'aux plaquettes, monocytes, neutrophiles, et à certains lymphocytes T. La phosphorylation du motif ITIM crée un site spécifique de liaison aux protéines tyrosine phosphatases contenant un domaine SH2 (Src-homology-2). Parmi celles-ci, on trouve SHP2 (SH-2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 2).

PECAM-1 se lie aux β - et γ -caténines associées à la VE-cadhérine dans les jonctions adhérentes (voir paragraphes 5.2.1 et 5.2.2 respectivement et **figure 5**). La β -caténine, phosphorylée sur tyrosine, se lie à PECAM-1, non phosphorylée (**Biswas et al., 2005**). Ainsi, PECAM-1 constituerait un réservoir de β -caténine phosphorylée à la membrane plasmique, ce qui éviterait soit sa dégradation par le protéasome, soit son transport dans le noyau, où elle exercerait sa fonction de facteur de transcription (voir paragraphe 5.2.1) (**Reya and Clevers, 2005**). Dans le même temps, SHP2, incluse dans le complexe ternaire PECAM-1/SHP2/ β -caténine, induit la déphosphorylation de la caténine, la rendant ainsi de nouveau disponible pour l'établissement de jonctions adhérentes (**Ilan and Madri, 2003**). Outre son rôle de séquestration de la β -caténine, PECAM-1 est également indirectement impliquée dans la

régulation de la perméabilité et de l'intégrité de l'endothélium vasculaire par ses interactions avec cette caténine.

L'intérêt de la liaison de PECAM-1 à la γ -caténine est moins évident. Il semble que la γ -caténine soit un lien entre PECAM-1 et les filaments intermédiaires de vimentine, grâce à son interaction avec la desmoplakine (Biswas et al., 2005; Ilan et al., 2000). Dans ce cas également, PECAM-1, en se liant à la γ -caténine, éviterait son transfert dans le noyau, où cette protéine exerce le rôle de facteur de transcription (Bazzoni and Dejana, 2004).

❖ Auto-association (détaillée) des cadhérines :

L'étude des interactions homophiliques régies par la VE-cadhérine suggère fortement que son domaine extracellulaire est capable de s'auto-assembler en une structure hexamérique (Al-Kurdi et al., 2004; Bibert et al., 2002; Legrand et al., 2001).

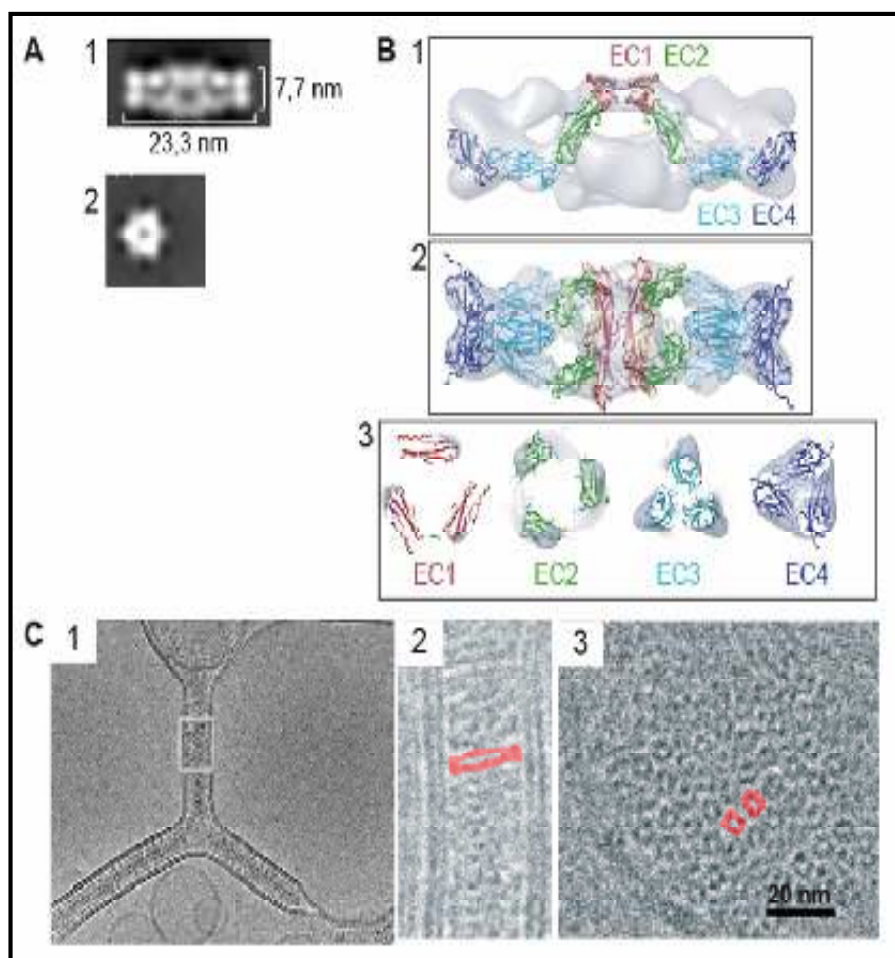


Figure 10. Architecture de l'hexamère de VE-cadhérine. D'après (Hewat et al., 2007; Lambert et al., 2005; Legrand et al., 2001).

L'étude par microscopie électronique d'un fragment recombinant comprenant les modules EC1 à EC4 a révélé l'existence de cette structure hexamérique en solution (**Legrand et al., 2001**). Elle apparaît comme un cigare creux de 23 nm de long et d'environ 8 nm de diamètre (**figure 10A**). La reconstitution tridimensionnelle de cette structure, établie à partir de plusieurs centaines d'images de l'hexamère tirées des clichés de microscopie électronique et en se référant à la structure tridimensionnelle de la partie extracellulaire de la C-cadhérine (**Boggon et al., 2002**), a montré que cet auto-assemblage serait en fait constitué de six molécules de VE-cadhérine agencées tête-bêche (**Hewat et al., 2007**) (**figure 10B**).

L'hexamère apparaît comme un trimère de dimères (**Figure 10B2**) où chaque dimère résulte de l'association anti-parallèle de deux monomères *via* les modules EC1 (**figure 10B1**), ce qui suggère que la VE-cadhérine s'homodimérise selon le mécanisme mis en évidence auparavant pour les cadhérines classiques (**Boggon et al., 2002**). La trimérisation se fait par l'intermédiaire des modules EC3-EC4, qui interagissent en *cis* (**figure 10B3**). Ces résultats confirment les observations faites par Ahrens et coll. sur l'auto-assemblage du domaine extracellulaire complet de la VE-cadhérine, produit en système eucaryote, en fusion avec le domaine N-terminal de la région « coil-coiled » de la protéine CMP (Cartilage Matrix Protein) (**Ahrens et al., 2003**). Effectivement, ce fragment s'auto-associe en trimère *cis* tout en étant capable d'élaborer des interactions *trans* via son module EC1. De plus, les travaux de Al Kurdi et coll. ont également mis en évidence par cristallographie 2D l'existence d'une interaction anti-parallèle régie par le module EC1 (**Al-Kurdi et al., 2004**). L'ensemble de ces résultats suggère que cette structure hexamérique anti-parallèle hélicoïdale constitue une « **unité adhérente** » de base à partir de laquelle les jonctions endothéliales peuvent s'élaborer.

Le greffage du fragment recombinant correspondant à la partie extracellulaire de la VE-cadhérine à la surface de liposomes induit la formation spontanée de pseudo-jonctions (**figure 10C1**). La distance entre les membranes des liposomes (23 ± 1 nm) est cohérente avec la taille des hexamères observés en solution (**Hewat et al., 2007; Legrand et al., 2001**). De façon surprenante, ces jonctions ont une morphologie tout à fait comparable à celle des desmosomes observés sur des coupes de peau humaine par cryo-microscopie électronique (**Al-Amoudi et al., 2005**). Une analyse plus détaillée montre que ces pseudo-jonctions adhérentes entre les liposomes sont composées d'objets en forme de cigares disposés côte à

côte perpendiculairement à la surface des liposomes (**figure 10C2**). En vue latérale, ces pseudo-jonctions adhérentes apparaissent constituées de l'empilement d'anneaux (**figure 10C3**), dont le diamètre correspond à celui des hexamères observés auparavant en solution (Legrand et al., 2001) (**figure 10A2**).

De ces études, il ressort qu'en solution, les structures hexamériques restent isolées les unes des autres, tandis que lorsqu'elles sont ancrées dans la membrane, elles peuvent s'organiser côte à côte élaborant ainsi les jonctions endothéliales (**figure 11**), comme observées par microscope électronique sous forme de bâtonnets (figure . Ces structures hexamériques pourraient glisser les unes par rapport aux autres latéralement et s'étirer dans le sens de la longueur, conférant une certaine flexibilité aux jonctions adhérentes. Enfin, cette structure hexamérique crée des interactions homophiliques entre molécules de VE-cadhérine vraisemblablement plus résistantes que celles mises en jeu par les cadhérines C, E et N (**Boggon et al., 2002; Panorchan et al., 2006**).

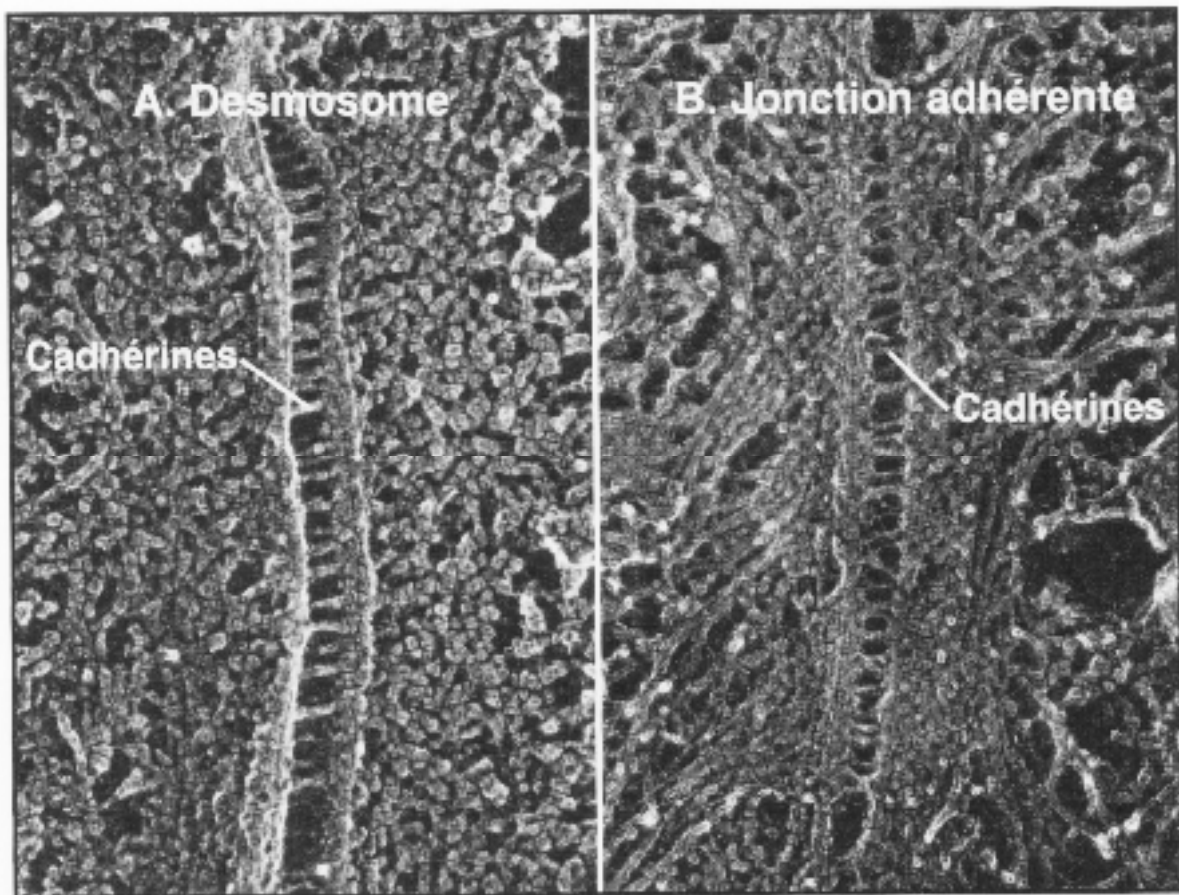


Figure. Micrographies électroniques de cadhérines reliant les membranes plasmiques de cellules adjacentes. Les entérocytes ont été préparés par congélation rapide, cryofracture

et cryodécapage avec ombrage rotatoire. **A.** Desmosome avec des filaments intermédiaires associés dans le cytoplasme. **B.** Jonction adhérente avec les filaments d'actine associés *

*Réf. : Hirokawa N, Heuser J. Quick-freeze, deep-etch visualization of the cytoskeleton beneath surface differentiations of intestinal epithelial cells ; J Cell Biol 1981 ; 91 : 399-409 ; et Thomas D, William C. Biologie Cellulaire, Elsevier 2004, p. 552

❖ Les autres cadhérines

1. N-Cadhérine

La N-cadhérine est l'autre cadhérine majeure exprimée par les cellules endothéliales, à des niveaux comparables à ceux de la VE-cadhérine (**Cavallaro et al., 2006; Navarro et al., 1998**). Il s'agit d'une cadhérine classique de type I (**Cavallaro et al., 2006; Nollet et al., 2000**). Elle est distribuée sur toute la surface cellulaire et il est généralement admis qu'elle ne se localise pas aux jonctions adhérentes. Il a été démontré qu'une courte séquence aminoacyle de la partie cytoplasmique de la VE-cadhérine est responsable de l'exclusion de la N-cadhérine des jonctions adhérentes (**Navarro et al., 1998**). Cependant une étude récente rapporte une co-localisation avec la VE-cadhérine aux jonctions (**Luo and Radice, 2005**). La N-cadhérine s'associe, comme la VE-cadhérine, aux β - et α -caténines, mais elle n'interagit que très peu avec p120 (**Navarro et al., 1998**).

Cette cadhérine régit les interactions des cellules endothéliales avec les péricytes ou les cellules musculaires lisses vasculaires de la paroi des vaisseaux (**Cavallaro et al., 2006**). L'absence de N-cadhérine semble n'interférer ni avec la différenciation de cellules précurseurs en cellules endothéliales, ni avec l'angiogenèse, mais perturbe fortement le recrutement des péricytes à la périphérie vasculaire (**Tillet et al., 2005**).

Ceci suggère que la N-cadhérine est nécessaire à la formation des vaisseaux. En conséquence, interférer avec la fonction de la N-cadhérine n'est pas létale mais provoque *in vivo* aussi bien qu'*in vitro* des défauts dans de la paroi vasculaire (**Cavallaro et al., 2006**).

Un rôle plus prépondérant pour la N-cadhérine a été proposé dans la morphogenèse des vaisseaux sanguins. En effet, sa délétion entraîne l'arrêt précoce du développement embryonnaire chez les souris mutantes, qui présentent des défauts importants de

vascularisation (**Luo and Radice, 2005**). Dans ces endothélia dépourvus de N-cadhérine, le niveau d'expression de la VE-cadhérine est faible, ce qui suggère que la N-cadhérine agirait sur la vascularisation en régulant l'expression de la VE-cadhérine. Ce phénotype n'est pas sans rappeler ceux observés par les équipes de E. Dejana et de P. Huber (**Carmeliet et al., 1999; Gory-Faure et al., 1999**) dans lesquels pourtant l'absence de VE-cadhérine n'est pas compensée par la présence de N-cadhérine.

En plus de son rôle dans la maturation des vaisseaux sanguins, la N-cadhérine est certainement impliquée dans la régulation de l'homéostasie endothéliale. Bien que Luo et coll (**Luo and Radice, 2005**) rapportent des données contraires, il semble que la N-cadhérine joue un rôle dans la protection contre l'apoptose (**Cavallaro et al., 2006**). Cette cadhérine serait également impliquée dans le contrôle de la prolifération des cellules endothéliales, leur mobilité et leur survie, même si les voies de signalisation concernées sont encore mal connues.

2. La protocadhérine 12

La protocadhérine 12 ressemble à une cadhérine classique, bien qu'elle possède six ectodomains EC (**Nollet et al., 2000; Suzuki, 2000**). Elle a été identifiée pour la première fois dans des lignées endothéliales, aux jonctions intercellulaires. Comme la VE-cadhérine, elle est capable de générer des interactions homophiliques dépendantes du calcium, mais les interactions contractées sont moins résistantes que celles mises en jeu par les cadhérines classiques (**Frank and Kemler, 2002; Telo et al., 1998**). Contrairement à la VE-cadhérine, elle ne s'associe pas avec les caténines et ne contracte que de très faibles interactions avec le cytosquelette

Elle est exprimée de façon variable en fonction du processus de vascularisation, très fortement dans les trophoblastes riches en glycogène et dans les cellules mésangiales du glomérule. Sa déficience ne présente pas de défauts morphologiques majeurs (**Rampon et al., 2005**). Il semblerait que cette parente de la VE-cadhérine n'est pas directement impliquée dans les jonctions adhérentes.

3. La T-Cadhérine

La T-cadhérine est un membre tout à fait particulier de la famille des cadhérines. Sa particularité réside dans le fait qu'elle ne possède ni domaine transmembranaire ni domaine

cytoplasmique, et se lie à la membrane plasmique grâce à son interaction avec un phospholipide particulier, le phosphatidylglycosylinositol (**Cavallaro et al., 2006; Nollet et al., 2000**).

Etant donnée l'absence de queue cytoplasmique, la T-cadhérine n'a aucune interaction avec les partenaires classiques des cadhérines, et encore moins avec le cytosquelette. Elle n'est pas recrutée aux contacts intercellulaires. Pourtant, elle joue certainement un rôle dans l'angiogenèse puisque sa surexpression a été observée dans des pathologies telles que l'athérosclérose ou la néovascularisation tumorale (**Fredette et al., 1996**).

Il a été suggéré que la T-cadhérine serait impliquée dans le « guidage » des cellules endothéliales lors de l'angiogenèse, mais rien n'a encore pu étayer cette hypothèse à ce jour.

AMINOQUANIDINE INHIBITEUR DE GLYCATION :

L'aminoguanidine, administrée à des rats diabétiques, dès le début de la maladie (Hammes *et al.*, 1991 et 1994) ou seulement après 6 mois de diabète (Hammes *et al.*, 1995), ralentit en effet le développement de la rétinopathie en prévenant la disparition des péricytes, la formation de microanévrismes et la néovascularisation (Hammes *et al.*, 1991), en limitant la formation de capillaires acellulaires et en abolissant la formation de microthrombi (Hammes *et al.*, 1994), phénomènes associés à une diminution de la formation d'AGE fluorescents au niveau de la rétine (Hammes *et al.*, 1995). Mais les effets protecteurs de l'aminoguanidine uniquement par son action anti-glycante sont aujourd'hui controversés. Le traitement de rats (Kern *et al.*, 2000) et de chiens diabétiques (Kern et Engerman, 2001) avec l'aminoguanidine n'a pas diminué les taux d'AGE circulants (hémoglobine-AGE) et d'AGE de collagène de la queue (pentosidine), bien que certaines lésions rétinienne aient été abolies (microanévrismes, capillaires acellulaires, disparition des péricytes).

L'aminoguanidine pourrait également protéger de certaines complications microvasculaires en agissant comme un antioxydant (Giardino *et al.*, 1998; Kowluru *et al.*, 2000) ou en réduisant la formation de NO par la NO synthase inductible (iNOS) (Corbett *et al.*, 1992; Kowluru *et al.*, 2000; Carmo *et al.*, 2000b), enzyme dont l'activité est augmentée dans la rétine de rats diabétiques (Carmo *et al.*, 2000b) et dont l'activation pourrait être corrélée à une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-rétinienne (Carmo *et al.*, 2000a).

LA MITOCHONDRIE : LIEN UNIFICATEUR ENTRE LES DIFFERENTS MECANISMES PATHOGENIQUES PROPOSES ET APOPTOSE DES PERICYTES

Récemment, l'équipe de Brownlee (Nishikawa *et al.*, 2000; Du X.L. *et al.*, 2000) vient de formuler une hypothèse biochimique reliant directement les ROS produits par la mitochondrie, plus particulièrement l'anion superoxyde, à la voie des polyols, à l'activation de la PKC, la formation d'AGE dérivés du méthylglyoxal, la voie des hexosamines et l'activation de NF- κ B.

Depuis la découverte de Bcl-2, protéine inhibant l'apoptose et située dans la membrane des mitochondries (Sentman *et al.*, 1991), de nombreux auteurs ont mis en évidence l'implication des mitochondries au cours du processus apoptotique. Leur participation dans l'apoptose est associée à une transition de la perméabilité membranaire (MTP) et un effondrement du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\psi_m$), résultant de l'ouverture de mégapores mitochondriaux. Du fait de sa haute concentration en solutés, un gonflement osmotique progressif de la matrice est parfois observé, dont l'aboutissement ultime est la rupture physique de la membrane externe. L'ouverture de ces pores est décrite comme l'étape d'intégration du signal apoptotique et de non-retour de la cellule vers l'apoptose. La MPT peut en effet être induite directement par de nombreux facteurs apoptotiques tels que : - le calcium, - les espèces réactives de l'oxygène, - un changement de pH (Crompton, 1999) et - Bax, protéine pro-apoptotique de la famille des Bcl-2 (Marzo *et al.*, 1998b), mais également de façon indirecte par : - des caspases, - des céramides, - la protéine p53 (suppresseur de tumeur), capables de moduler l'activité de protéines de la famille des Bcl-2 (cf chapitre La famille des Bcl-2).

ANNEXE II

ACTIVATION DU NF- κ B

Le NF- κ B est activé par divers *stimuli*, tels l'augmentation des concentrations de glucose intracellulaire, le stress oxydant, les cytokines pro-inflammatoires, l'angiotensine II, l'activation des récepteurs RAGE par les AGE (9). Activé, le NF- κ B active les gènes du VEGF, du TGF- α et de l'IL- β , du récepteur RAGE, des molécules d'adhésion (VCAM-1).

(9) Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signalling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2002; 23: 599-622
 Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes* 1996 ; 19 : 257-67

ANNEXE III

Les autres modèles animaux pour l'étude du diabète de type 2

Plusieurs modèles animaux ont été développés pour étudier la résistance à l'insuline. Par exemple les souris *knockout* conventionnelles pour le gène IRS-1 démontrent une intolérance au glucose et une diminution de la stimulation du captage du glucose par l'insuline.

De plus, une récente technique a grandement été améliorée afin d'étudier la résistance à l'insuline dans des tissus spécifiques par l'inactivation conditionnelle de gènes chez la souris. Par exemple, le système Cre-lox-P est utilisé pour interrompre le gène du récepteur à l'insuline dans le muscle squelettique précisément chez la souris, ce qui permet de déterminer la contribution métabolique de la résistance à l'insuline musculaire sur le phénotype du diabète.

	Durée en mois	Poids des <i>Psammomys</i> (g) soumis au	
		RN	RHC
Moyenne ± ESM	0	68.80 ± 1.33	77.40 ± 0.78
Moyenne ± ESM	3	78.70 ± 1.51	104.40 ± 0.95****
Moyenne ± ESM	6	89.80 ± 1.51	116.65 ± 0.84****
Moyenne ± ESM	9	97.30 ± 1.44	121.33 ± 0.81****

Tableau VII : Evolution pondérale des *psammomys obesus* témoins soumis au RN et les *psammomys obesus* soumis au RHC pendant 9 mois

- Hautement significative si $P < 0.0001$ (****)

	Durée en mois	Glycémie en mg/100ml des <i>Psammomys</i> soumis au	
		RN	RHC
Moyenne ± ESM	0	64.70 ± 1.12	63.13 ± 0.65****
Moyenne ± ESM	3	63.70 ± 1.18	183.27 ± 4.82****
Moyenne ± ESM	6	67.00 ± 0.96	198.33 ± 5.08****
Moyenne ± ESM	9	73.10 ± 1.02	201.33 ± 7.12****

Tableau VIII : Evolution de la glycémie en mg/100ml des *Psammomys obesus* témoins soumis au RN et des *Psammomys obesus* soumis au RHC pendant 9 mois.

- Hautement significative si $P < 0.0001$ (****)

	Durée en mois	Triglycéridémie en mg/100ml des <i>Psammomys</i> soumis au	
		RN	RHC
Moyenne ± ESM	0	67.70 ± 0.85	76.67 ± 0.95
Moyenne ± ESM	3	64.50 ± 0.91	197.80 ± 5.35****
Moyenne ± ESM	6	68.30 ± 0.99	234.34 ± 7.15****
Moyenne ± ESM	9	73.80 ± 0.98	243.53 ± 6.92****

Tableau IX : Evolution de la triglycéridémie en mg/100ml des *psammomys obesus* témoins soumis au RN et des *psammomys obesus* soumis au RHC pendant 9 mois.

- Hautement significative si $P < 0.0001$ (****)

	Durée en mois	Cholestérolémie en mg/100ml des <i>Psammomys</i> soumis au	
		RN	RHC
Moyenne ± ESM	0	54.90 ± 0.78	52.60 ± 0.56
Moyenne ± ESM	3	54.80 ± 0.88	133.07 ± 4.51****
Moyenne ± ESM	6	60.30 ± 1.08	136.87 ± 3.70****
Moyenne ± ESM	9	58.00 ± 1.10	137.20 ± 3.80****

Tableau X : Evolution de la cholestérolémie en mg/100ml des *psammomys obesus* témoins soumis au RN et des *psammomys obesus* soumis au RHC pendant 9 mois.

- Hautement significative si $P < 0.0001$ (****)

	Durée en mois	Insulinémie en $\mu\text{UI/ml}$ des <i>Psammomys</i> soumis au	
		RN	RHC
Moyenne \pm ESM	0	26.20 \pm 0.48	22.07 \pm 0.42
Moyenne \pm ESM	3	24.40 \pm 0.45	265.60 \pm 6.31****
Moyenne \pm ESM	6	25.30 \pm 0.38	280.40 \pm 6.13****
Moyenne \pm ESM	9	27.50 \pm 0.44	364.07 \pm 7.30****

Tableau XI : Evolution de l'insulinémie en $\mu\text{UI/ml}$ des *psammomys obesus* soumis au RN et des *psammomys obesus* soumis au RHC pendant 9 mois.