

République Algérienne Démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Blida I
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire



Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de Master

Option: Biosignalisation Moléculaire et Cellulaire; Immunologie

Thème

La mise en évidence du processus de l'angiogenèse
au cours de la rétinopathie diabétique chez un
animal modèle nutri-induit; *Psammomys obesus*

Réalisé par :
Mlle HELAL Sarah

Soutenu le 20/09/2015

Devant le jury composé de :

Présidente : Mme Eddaikra.A

MAA USDB/BPC

Examineur : Mme Kanane.A

MAA USDB/BPC

Promotrice : Mme Benazouz

MAA USDB/BPC

Co-promotrice : Pr. Hannachi.L

Professeur CHU Mustapha-Pasha

Promotion 2014/2015

Dédicace

À mes très chers parents

Aucune dédicace, aucun mot, ne saurait exprimer réellement mon profond amour, mon respect et ma vive gratitude. Veuillez trouver dans ce travail le fruit de toutes vos peines et vos sacrifices.

Ma mère, pour sa compréhension et sa générosité. Tu as toujours su faire de mon environnement de vie un endroit agréable et propice à la réussite. Sans toi, je ne serai pas la femme que je suis aujourd'hui.

Mon père, pour son soutien moral. Dès mon jeune âge, tu as su me transmettre ton goût pour les sciences et c'est en grande partie grâce à toi que j'ai fait ce cheminement de carrière. Merci pour ton aide, tes corrections, ton orientation avisé et pour ta contribution à la réalisation de ce travail.

Que Dieu vous bénisse et vous garde pour moi.

À mon petit frère Nassim.

A mon cousin Hanni, Ma tante Hassiba.

À mes meilleures amies : Sabiha et Tiha, merci d'avoir été à mes côtés pendant tous les Bons et les Mauvais moments.

Remerciements

A Madame Eddaikra Akila, vous me faites l'honneur de présider cette thèse. Merci pour votre dynamisme et vos qualités humaines.

A Madame Kanane Amel, Qui me fait l'honneur de juger ce travail, et de nous faire bénéficier de votre expérience. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de mon plus profond respect.

Je tiens tout d'abord à remercier Mme Benazouz Fella, ma directrice de mémoire, pour m'avoir proposé cette aventure, pour avoir toujours été là pour me soutenir et me guider dans ce travail, pour tout le soutien, l'aide, l'orientation, la guidance que vous m'avez apporté durant les trois années de mon cursus en spécialité, ainsi que pour vos précieux conseils, vos encouragements et votre disponibilité lors de la réalisation de ce mémoire.

Je remercie également Pr. Hannachi Leila, ma co-promotrice, pour son accueil au sein du service d'anatomo-pathologie du CHU Mustapha Pasha, pour les précieuses corrections apportées à ce manuscrit, pour sa générosité et la grande patience dont elle a su faire preuve malgré ses charges professionnelles.

J'adresse mes remerciements au Dr. Kouchkar Amel, pour son chaleureux accueil au sein du laboratoire d'anatomie-pathologique du CPMC, pour avoir contribué à l'élaboration d'une partie du travail pratique, sa gentillesse, sa disponibilité, et ses précieux conseils m'ont été d'un grand secours.

Je tiens à remercier également le Dr. Rahmani Hamza, pour m'avoir permis d'effectuer une partie de ce travail au sein du laboratoire d'anatomie-pathologique du CHU de Médéa, pour sa gentillesse, ses précieux conseils et sa disponibilité au cours de ce travail.

Merci à Mr Brahim Errahmani Mohamed, pour les précieuses corrections apportées à ce manuscrit, pour sa générosité et ses conseils.

J'exprime ma profonde gratitude au Professeur Helal Ourkia-Badia, pour l'attention porté à ce travail, pour son soutien, sa disponibilité et ses précieux conseils. Merci pour ces longues heures passées à corriger mon mémoire, sans votre aide, cette thèse n'aurait jamais pu être menée à bien.

J'exprime aussi une profonde reconnaissance pour Mme Aissani Radia, pour sa grande disponibilité et ses conseils qui m'ont guidé tout au long de mes études et mes projets de recherche. Merci d'avoir partagé avec moi votre expérience, votre savoir et vos idées.

Je remercie également Negab Imene, pour son aide, ses conseils bienveillants.

Je tiens à remercier tous mes professeurs et spécialement ceux de la spécialité de biologie moléculaire et cellulaire.

Enfin, je remercie mes camarades de promotion pour ces trois années passées ensemble. Sans oublier mes ami(e)s de loin ou de proche qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Merci à toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont participé à l'élaboration de ce mémoire.

J'exprime aussi ma gratitude à mes parents, mon frère.

Dieu merci.

Résumé

La rétinopathie diabétique (RD) représente une des complications les plus fréquentes et les plus précoces des micro-angiopathies diabétiques, et la cause principale de cécité chez l'adulte dans les pays développés. Le problème majeur à l'origine de la perte de vision liée à la RD, est la croissance anormale de néo-vaisseaux rétiniens par un processus d'angiogenèse. Ce processus nécessite l'intervention coordonnée de multiples facteurs qui interviennent dans les différentes étapes aboutissant à la formation d'un nouveau vaisseau par des voies complexes et enchevêtrées.

L'objectif de cette étude est de montrer la complexité de l'analyse des effets de l'hyperglycémie chronique sur l'angiogenèse et le développement des complications vasculaire caractéristiques des stades avancés de la rétinopathie diabétique chez la gerbille *Psammomys obesus*, suite à un régime hypercalorique, et ceci par l'évaluation du poids corporel et la mesure régulière des différents paramètres biochimiques plasmatiques : glycémie, triglycéridémie, cholestérol plasmatique et insulïnémie.

Une mise en évidence complémentaire de l'expression de cinq marqueurs angiogéniques clés, VEGF, VE-cadhérine, CD34, CD31 et vWF a été effectuée par Immunomarquage.

Nos résultats démontrent clairement des altérations dans la structure des microvaisseaux rétiniens, se manifestant par des dilatations et des occlusions capillaires, et des ruptures des barrières hémato-rétiniennes par déstabilisations des jonctions intercellulaires impliquant la VE-cadhérine déficiente qui présente un contraste d'expression avec le VEGF excessif. En parallèle, la présence de néo-vaisseaux a été mise en évidence par le trio de marqueurs endothéliaux : CD34, CD31 et vWF.

Mots clés : Rétinopathie diabétique ; Hyperglycémie ; Marqueurs angiogéniques ; Néo-vaisseaux ; Immuno-histochimie ; *Psammomys obesus*.

Abstract

Diabetic retinopathy (DR) is one of the most common complications and the earliest diabetics' micro-angiopathy, and the leading cause of adult blindness in developed countries. One major problem cause most vision loss related to DR is the abnormal retinal blood vessels growth through a process of angiogenesis. This process requires the coordinated involvement of multiple factors in the steps leading to the formation of a newly formed vessel by complex and tangled paths.

The purpose of this study is to show the complexity of the analysis of the effects of chronic hyperglycemia on angiogenesis and the development of vascular complications characteristics of advanced stages of diabetic retinopathy in the gerbil sand rat, following a diet calorie, by assessing body weight and regular monitoring of various plasma biochemical parameters: blood glucose, triglycerides, plasma cholesterol and insulin levels. An additional demonstration of the expression of five key angiogenic markers, VEGF, VE-cadherin, CD34, CD31 and vWF was performed.

Our results clearly demonstrate alterations in the structure of retinal microvessels, manifested by expansion and capillary occlusions, ruptures of the blood-retinal barriers by destabilization of intercellular junctions involving deficient VE-cadherin that has a contrast with the VEGF-excessive expression. In parallel, the presence of neo-vessels was demonstrated by the trio of endothelial markers: CD34, CD31 and vWF.

Keywords: Diabetic Retinopathy; Hyperglycemia; Angiogenic markers ; Neo-vessels; Immunohistochemistry ; The sand rat.

اعتلال الشبكية السكري يمثل الأكثر شيوعاً, اعتلال الأوعية الدموية الدقيقة

, و هو العامل الرئيسي لفقدان البصر للبالغين في البلدان الصناعية. المشكلة الرئيسية المتسببة في فقدان البصر

المرتبطة باعتلال الشبكية السكري، هو النمو الغير طبيعي للأوعية الدموية الجديدة شبكية العين

عملية تكوين الأوعية الدموية. تتطلب هذه العملية المشاركة المنسقة لعوامل متعددة في الخطوات المؤدية إلى تشكيل

الأوعية الدموية الجديدة بطرق معقدة ومتشابكة.

الهدف من هذه الدراسة هو إظهار مدى تعقيد تحليل آثار الارتفاع المزمن الدم على عملية تكوين الأوعية

الدموية وتطور المضاعفات الوعائية التي تميز المراحل المتقدمة من اعتلال الشبكية السكري

نظام غذائي عالي السعرات الحرارية وذلك عن طريق تقييم وزن الجسم وقياس مختلف المعالم البلازمية كنسبة السكر في

, الدهون الثلاثية, نسولين. تم تعيين CD31, CD34, VE-cadherine, VEGF

vWF عبر التقنية المناعية.

نتائجنا تظهر بوضوح التغييرات في بنية الأوعية الدموية الصغيرة في شبكية العين، والتي تجلت من خلال توسع

وانسداد الشعيرات الدموية، وتمزق حواجز الدم في شبكية العين عن طريق زعزعة الاستقرار بين الخلايا

VE-cadherine والتعبير المفرط VEGF. وقد تجلى وجود الأوعية الدموية الجديدة من قبل : CD34

.vWF CD31

: اعتلال الشبكية السكري , الأوعية الدموية , التقنية المناعية

GLOSSAIRE

- **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.
- **Angiographie** : c'est une technique d'imagerie médicale portant sur les vaisseaux sanguins. Elle impose l'injection d'un produit de contraste lors d'une imagerie par rayons X.
- **Exsudat** : Liquide organique séreux, fibrineux ou muqueux, qui suinte au niveau d'une partie enflammée.
- **Fond d'œil** : En ophtalmologie, le fond d'œil est un examen simple permettant d'examiner le fond de l'œil. Il permet d'observer la rétine et ses vaisseaux, la papille optique (tête du nerf optique), la macula.
- **Hémodynamique** : Partie de la physiologie étudiant les lois d'écoulement de la masse sanguine dans les vaisseaux en fonction du débit cardiaque.
- **Hémostase** : Ensemble des phénomènes physiologiques qui concourent à la prévention et à l'arrêt des saignements et participe à la réparation de la brèche vasculaire et assure le maintien de l'intégrité des vaisseaux.
- **Hypoxie** : Diminution de la quantité d'oxygène distribuée par le sang aux tissus.
- **Insulino-résistance** : désigne une réponse biologique à l'insuline diminuée ou défectueuse in vivo. Elle est caractéristique du diabète non insulino-dépendant et concerne la majorité des tissus cibles
- **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.

- **Microanévrisme** : Anévrisme survenant au niveau des petits vaisseaux.
- **Microangiopathie** : Toute maladie atteignant les vaisseaux sanguins de petit calibre.
- **Œdème** : Gonflement survenant dans les tissus sous-cutanés par suite d'infiltration de sérosités dans le milieu interstitiel.
- **Photorécepteurs** : Les photorécepteurs sont des cellules sensorielles ou des organes spécialisés dans la détection de la lumière.
- **Thrombose** : obstruction d'une veine ou d'une artère par un thrombus (ou caillot).
- **Vasodilatation** : Augmentation du calibre des vaisseaux sanguins par relâchement de leurs cellules musculaires.

LISTE DES ABREVIATIONS

AA	:	Acide Arachidonique.
AGE	:	Advanced glycation end-products (Produits terminaux de la glycation avancée).
BHR	:	Barrière hémato-rétinienne.
CE	:	Cellule Endothéliale.
CD31	:	Cluster de Différentiation 31.
CD34	:	Cluster de Différentiation 34.
CML	:	Cellule Musculaire Lisse.
DAG	:	Diacyl glycérol.
DCCT	:	Diabetes control and complications trial.
DNID	:	Diabète non insulino-dépendant ou Diabète de type 2.
DS	:	Diabète Sucré.
DT1	:	Diabète de Type 1.
DT2	:	Diabète de Type 2.
ESM	:	Erreur Standard à la Moyenne.
FID	:	Fédération Internationale du Diabète.
FVIII	:	Facteur VIII.
HE	:	Coloration hématoxyline éosine.
HIF	:	Hypoxia Induced Factor.
IHC	:	Immuno-Histo-Chimie.
MEC	:	Matrice extra-cellulaire.
NF B	:	Nuclear factor-kappa B.
OMS	:	Organisation Mondiale de la Santé.

PECAM	:	Platelet/endothelial cell adhesion molecule.
PKC	:	Protéine Kinase C.
PO	:	<i>Psammomys obesus</i>
RD	:	Rétinopathie Diabétique.
RDNP	:	Rétinopathie diabétique non-proliférative.
RDP	:	Rétinopathie diabétique proliférative.
RHC	:	Régime Hyper-Calorique.
RN	:	Régime Normal.
TG	:	Triglycérides.
UKPDS	:	United Kingdom Prospective Diabetes Study.
VE-cadhérine	:	Vascular Endothelial-cadherin (cadhérine endothéliale vasculaire).
VEGF	:	Vascular Endothelial Growth Factor.
VEGF-R	:	Récepteur au VEGF.
vWF	:	Facteur de Von Willbrand.

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Fond d'œil de patients avec une rétinopathie diabétique différents stades.	5
2	Représentation schématique de la progression de la rétinopathie diabétique.	6
3	Structure des différents types de vaisseaux sanguins.	9
4	Anatomie de l'œil humain.	10
5	Structure de la rétine.	12
6	Diagramme de l'organisation moléculaire des jonctions endothéliales et de leur entrelacement.	16
7	vasculogenèse, angiogenèse et artériogenèse.	19
8	Les différentes étapes de l'angiogenèse	20
9	Représentation schématique des facteurs endogènes angiogéniques et angiostatiques.	21
10	Le VEGF, ses récepteurs et leurs effets biologiques.	23
11	Photographie du fond d'œil qui montre une hémorragie en forme de bateau dans l'œil gauche, avec néovascularisation émanant du disque optique.	25
12	Étapes de l'angiogenèse et principaux facteurs de croissance impliqués.	26
13	<i>Psammomys obesus</i> au laboratoire (photo originale).	30
14	Prélèvement sanguin rétro-orbital chez <i>Psammomys obesus</i> .	34
15	Prélèvement des globes oculaires chez <i>Psammomys obesus</i> .	34
16	Représentation graphique de l'évolution pondérale en g des PO témoins soumis au RN et des PO soumis au RHC pendant 13 mois.	46
17	Représentation graphique de l'évolution de la glycémie en mg/100ml des PO témoins soumis au RN et des PO soumis au RHC pendant 13 mois.	47
18	Représentation graphique de l'évolution de la triglycéridémie des PO témoins soumis au RN et des PO soumis au RHC pendant 13 mois.	48
19	Représentation graphique de l'évolution de la cholestérolémie en mg/100ml des PO témoins soumis au RN et des PO soumis au RHC pendant 13 mois.	49
20	Représentation graphique de l'évolution de l'insulinémie en μ UI/ml des PO témoins soumis au RN et des PO soumis au RHC pendant 13 mois.	50
21	Planche I : Coupe histologique de la rétine humaine et celle de <i>Po</i> .	52

22	Planche II : Coupes histologiques de la rétine de <i>Po</i> fœtal colorées à l'hématoxyline éosine.	55
23	Planche III : Coupes histologiques de la rétine de <i>Po</i> diabétique colorée à l'hématoxyline éosine.	58
24	Planche IV : Coupes histologiques de la rétine de <i>Po</i> diabétique colorées à l'hématoxyline éosine.	60
25	Planche V : Coupes histologiques de la rétine de <i>Po</i> : fœtal et diabétique marquées au VEGF.	64
26	Planche VI : Coupe histologique de la rétine de <i>Po</i> marquée à la VE-cadhérine	67
27	Planche VII : Coupe histologiques de la rétine de <i>Po</i> diabétique marquée au CD31.	70
28	Planche VIII : Coupe histologiques de la rétine de <i>Po</i> diabétique marquée au vWF.	73
29	Planche IX : Coupe histologiques de la rétine de <i>Po</i> diabétique marquée au CD34.	75
30	Nombre de personnes atteintes de diabète dans le monde.	79
31	la voie des polyols	83
32	L'activation des PKC	84
33	La voie des hexosamines et conséquences.	85
34	Biotope des plantes halophile dont se nourrit <i>Psammomys obesus</i> .	92

Index des tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Protocole de dosage des solutions réactionnelles (dosage de glucose, TG, cholestérol).	37
2	Régions de la FID et projections mondiales concernant le nombre de personnes atteintes de diabète (20-79 ans), 2013 et 2035.	81
3	Les différentes étapes de la chasse du <i>Psammomys obesus</i> .	90
4	La composition centésimale du régime naturel.	91
5	La composition alimentaire pour 100g de ce régime hypercalorique.	91
6	Evolution pondérale des <i>psammomys obesus</i> témoins soumis au RN et les <i>psammomys obesus</i> soumis au RHC pendant 13 mois.	92
7	Evolution de la glycémie en mg/100ml des <i>Psammomys obesus</i> témoins soumis au RN et des <i>Psammomys obesus</i> soumis au RHC pendant 13 mois.	93
8	Evolution de la triglycéridémie en mg/100ml des <i>psammomys obesus</i> témoins soumis au RN et des <i>psammomys obesus</i> soumis au RHC pendant 13 mois.	93
9	Evolution de la cholestérolémie en mg/100ml des <i>psammomys obesus</i> témoins soumis au RN et des <i>psammomys obesus</i> soumis au RHC pendant 13 mois.	94
10	Evolution de l'insulinémie en μ UI/ml des <i>psammomys obesus</i> soumis au RN et des <i>psammomys obesus</i> soumis au RHC pendant 13 mois.	94

Table des matières

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS

INDEX DES TABLEAUX ET FIGURES

INTRODUCTION.....1

CHAPITRE I : APPROCHE THEORIQUE

I.	RETINOPATHIE DIABETIQUE (RD).....	4
	I.1. Epidémiologie de la rétinopathie diabétique.....	4
	I.2. Evolution de la rétinopathie diabétique.....	4
	I.2.1. Stades précoces de la rétinopathie diabétique	5
	I.2.2. Stades avancées de la rétinopathie diabétique	7
	I.3. Pathogenèse de la rétinopathie diabétique.....	7
	I.4. Traitements.....	8
II.	SYSTEME VASCULAIRE.....	9
	II.1. RESEAU VASCULAIRE.....	9
	II.1.1. Structure des micro-vaisseaux.....	9
	II.1.2. Microvaisseaux au sein de l'œil.....	10
	II.1.2.1. Anatomie du globe oculaire.....	10
	II.1.2.2. Rétine.....	11
	II.1.2.3. Vascularisation rétinienne.....	13
	II.2. ENDOTHELIUM VASCULAIRE.....	13
	II.2.1. Structure de l'endothélium.....	13
	II.2.2. Fonctions de l'endothélium.....	13
	II.2.3. Jonctions endothéliales.....	14
	II.2.3.1. Complexus adhaerens.....	14
	II.2.3.2. Jonctions communicantes.....	14
	II.2.3.3. Jonctions serrées.....	15
	II.2.3.4. Jonctions adhérentes.....	15
III.	DEVELOPPEMENT VASCULAIRE ET ANGIOGENESE.....	17
	III.1. DEVELOPPEMENT VASCULAIRE	17
	III.1.1. De la vasculogenèse à l'angiogenèse.....	18

III.2. ANGIOGENESE.....	18
III.2.1. Mécanismes moléculaires de l'angiogenèse.....	19
III.2.2. Régulations de l'angiogenèse.....	21
III.3. ANGIOGENESE PATHOLOGIQUE.....	23
III.3.1. Généralités.....	23
III.3.2. Processus moléculaire et cellulaire de la re-vascularisation post-rétinopathie diabétique.....	24
III.3.3. Inflammation et rétinopathie diabétique.....	26
III.3.4. Cellules endothéliales et immunoréactivité.....	27
III.3.4.1. Antigène CD34.....	27
III.3.4.2. Facteur VIII.....	28

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1. MATERIEL BIOLOGIQUE.....	30
II.1.1. Notre modèle expérimental et son régime alimentaire.....	30
II.1.1.1. <i>Psammomys obesus</i> : biotope et echophysiology...30	
II.1.1.2. Métabolisme de notre animal et son importance dans notre étude.....	30
II.2. MISE EN ŒUVRE EXPERIMENTALE.....	31
II.2.1. Capture et conditionnement des animaux au laboratoire.....	31
II.2.2. Régimes alimentaires.....	32
II.3. EXPERIMENTATIONS IN VITRO.....	33
II.3.1. Techniques opératoires.....	33
II.3.1.1. Contrôle du poids corporel.....	33
II.3.1.2. Prélèvement des échantillons.....	33
II.3.2. Techniques analytiques.....	34
II.3.2.1. Dosages plasmatiques (Glucose, Triglycéride, cholestérol, insuline).....	34
II.3.2.1.1. Principes des dosages.....	35
II.3.2.1.2. Modes opératoires.....	36
II.3.2.1.3. Méthodes de calcul.....	37

II.3.3. Etude statistique.....	38
II.3.4. Technique histologique.....	40
II.3.4.1. Préparation des coupes.....	40
II.3.4.2. Coloration à l'hématoxyline-éosine.....	41
II.3.4.3. Immunohistochimie CD34, CD31 et Facteur VIII...	42

CHAPITRE III : RESULTATS & DISCUSSION

III.1. RESULTATS.....	45
III.1.1. Résultats métaboliques.....	45
III.1.1.1. Evolution du poids corporel	45
III.1.1.2. Comparaison des paramètres biochimiques.....	46
III.1.1.2.1. Glycémie.....	46
III.1.1.2.2. Triglycéridémie.....	47
III.1.1.2.3. Cholestérolémie.....	48
III.1.1.2.4. Insulinémie.....	49
III.1.1.3. Discussion des résultats métaboliques	50
III.1.2. Résultats et discussions de l'étude histologique et immunohistochimique.....	51

CONCLUSION & PERSPECTIVES.....78

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

Introduction

Le diabète est la maladie endocrinienne la plus répandue dans le monde, (**Kowluru et Chen, 2007**). Les dernières estimations de la fédération internationale de diabète (FID) indiquent que 8,3% d'adultes – 382 millions de personnes – sont atteintes de diabète et le nombre de personnes atteintes de cette maladie est supposé dépasser les 592 millions dans moins de 25 ans. (**IDF, 2014**).

En Algérie, le diabète touche plus de 4 millions de personnes. Il devient un véritable fléau, qui prend une ampleur inquiétante et nécessite une meilleure prise en charge (**OMS, 2015 ; IDF, 2013**).

L'hyperglycémie chronique, caractéristique des syndromes diabétiques, est à l'origine d'altérations dans la structure et la fonction des microvaisseaux et des macrovaisseaux. Ces lésions vasculaires sont responsables de l'essentiel de la morbidité et de la mortalité observées chez les diabétiques. La cible principale de la toxicité chronique de l'hyperglycémie est la cellule endothéliale vasculaire. L'ischémie secondaire aux lésions vasculaires déclenche une réponse angiogénique. Chez le diabétique, cette réponse angiogénique à l'ischémie diffère selon le tissu en cause, excessive dans certains organes comme la rétine, elle est le plus souvent déficiente ailleurs (**Larger, 2003**).

La rétinopathie diabétique (RD) représente une des complications les plus fréquentes et les plus précoces des micro-angiopathies diabétiques et la cause principale de cécité chez l'adulte dans les pays développés. (**Fong et al., 2004**). C'est une maladie à forte prévalence, qui touche 100% des personnes atteintes d'un DT1, et 60% de celles qui souffrent d'un DT2 depuis 15ans ou plus (**Raccach., 2004**).

La RD se caractérise par une atteinte progressive structurale et fonctionnelle des microvaisseaux rétinien. Les lésions histologiques de la RD sont l'épaississement de la membrane basale, les microanévrismes, un œdème maculaire diabétique, la perte des péricytes puis celle des cellules endothéliales des capillaires rétinien, aboutissant à leur obstruction ainsi qu'à la rupture de la barrière hémato-rétinienne (BHR), responsable de leur perméabilité, et, finalement, la néovascularisation s'installe au stade final de la pathologie (**Massin, 2010 ; Yang, 2010**).

Deux problèmes majeurs sont la cause de la perte de vision liée au diabète : l'œdème maculaire et les complications issues de la néovascularisation rétinienne (croissance de vaisseaux anormaux) (**Crawford et al., 2009**).

Avec la néovascularisation, des vaisseaux néoformés anormaux prolifèrent à partir de la rétine. Ces vaisseaux anormaux ont tendance à saigner au niveau du vitré, conduisant à une réduction de la vision. Ils sont associés à une composante fibreuse (des tissus fibreux) attachée à la rétine, qui, une fois contractée, conduit au détachement de la rétine. Ainsi la néovascularisation présente un risque de perte de vision. Sans un traitement chirurgical, la néovascularisation induira un risque élevée d'hémorragie et une cécité (**Crawford et al., 2009**).

Cliniquement, les anomalies de la néovascularisation post-RD sont mises en évidence au cours d'examen du fond d'œil et des angiographies à la fluorescéine.

Sur un plan histologique, l'observation de ces altérations étant impossible chez l'Homme, le recours à des modèles expérimentaux s'impose donc pour l'étude du développement de la RD.

En menant notre étude nous avons pu soulever la problématique suivante ; les questions que nous nous sommes posées sont comme suit :

- **Existe-il une corrélation entre la structure histologique de la rétine normale chez l'Homme et celle de *Psammomys obesus* témoin (non-diabétique) ?**
- **L'hyperglycémie à long terme contribue-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* ?**
- **Quel intérêt présente la BHR au cours du développement embryonnaire et au stade adulte ?**
- **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 ?**
- **A quel stade de l'évolution de la rétinopathie diabétique on constate le phénomène d'angiogenèse ?**

Pour cela, nous avons utilisé un modèle d'étude animal ; *Psammomys obesus* : rat des sables diurne, que nous avons rendu diabétique (diabète de type 2 ; DT2) en le soumettant à un régime hypercalorique (RHC) pendant une durée de 13 mois pour l'étude du DT2 et de ses complications microvasculaires.

Afin de répondre à nos interrogations, nous avons adopté le plan suivant :

- **Analyser et suivre les modifications des paramètres biochimiques plasmatiques au cours de l'évolution du syndrome métabolique diabétique afin de déterminer si le RHC, à lui seul, est capable d'induire un DT2 chez le modèle d'expérimentation choisi.**

- **Observer les modifications induites par la chronicité de l'hyperglycémie au niveau de la rétine et suivre l'évolution du processus angiogénique au cours des différentes phases de la RD. Pour cela, nous avons exploré les coupes histologiques rétiniennes du rat adulte sain et nous les avons comparés à celles du rat diabétique. D'abord sans marquage pour voir l'ensemble des structures, puis aux marquages successifs par le VEGF et la VE-cadhérine, le CD34, le CD31 et le vWF.**

Chapitre I

Approches Théoriques

CHAPITRE I : APPROCHES THEORIQUES**I. RETINOPATHIE DIABETIQUE**

La rétinopathie diabétique (RD) regroupe des lésions de la rétine caractéristiques chez des personnes ayant un diabète sucré (DS) depuis plusieurs années. Les anomalies rétiniennes qui caractérisent la rétinopathie diabétique suivent une évolution prédictible sans variations majeures dans leur ordre d'apparition. (OMS, 2015).

I.1. EPIDEMIOLOGIE DE LA RETINOPATHIE DIABETIQUE

De grandes études épidémiologiques ont permis de mieux cerner la prévalence des complications rétiniennes de la RD. On estime qu'environ 30% des diabétiques sont porteurs d'une rétinopathie. (UKPDS, 2007)

La rétinopathie diabétique est aussi fréquente au cours du diabète de type 1 qu'au cours du diabète de type 2 (Klein *et al.*, 1995) :

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 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. EVOLUTION DE LA RETINOPATHIE DIABETIQUE

La Rétinopathie diabétique est une pathologie progressive qui affecte la vascularisation rétinienne (AAO, 2003). Cette dernière est divisée en deux stades basés sur l'état de prolifération de la vascularisation de la rétine: un stade précoce et non prolifératif (RDNP; Fig1A), et un stade avancé, prolifératif ou néovasculaire (RDP; Fig1B). (Tang et Kern, 2011) (Chen *et al.*, 2009) (Cheung *et al.*, 2010).

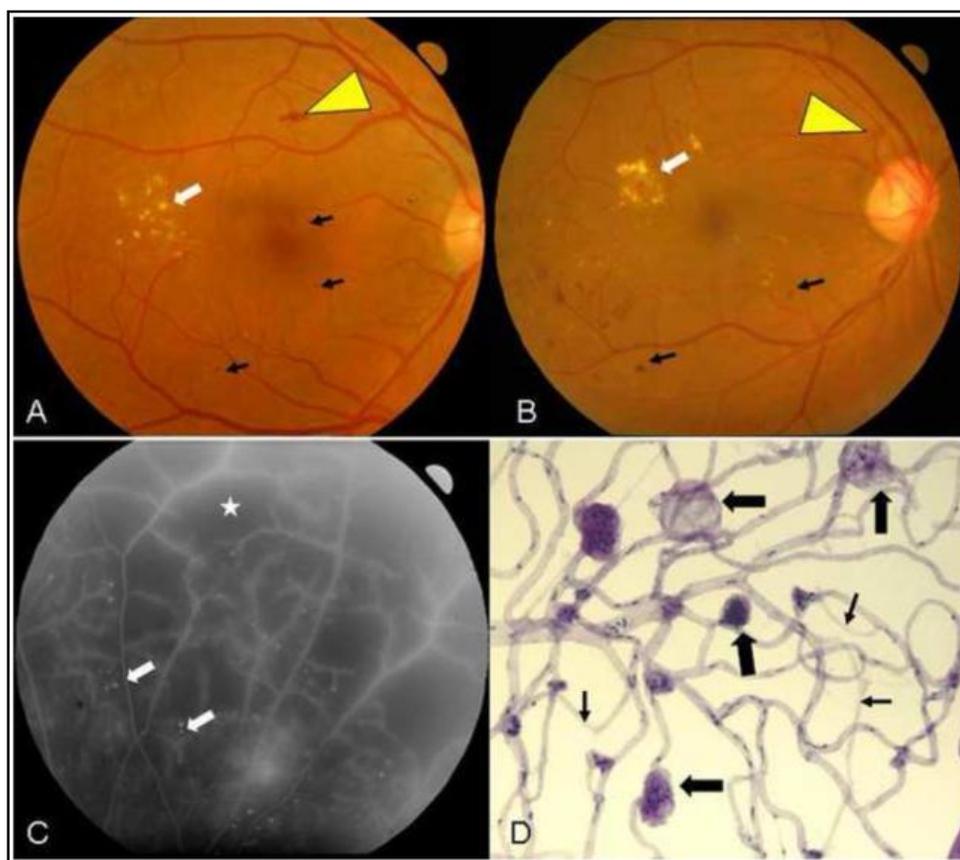


Figure 1 : Image A. Fond d'œil d'un patient avec une rétinopathie diabétique non proliférante modérée (RDNP). Les microanévrismes peuvent être vus (flèches noires) avec une zone contenant une hémorragie (tête de flèche jaune) et les exsudats (flèches blanches) temporelles de la fovéa. **Image B. Fond d'œil d'un patient avec une rétinopathie diabétique proliférante (RDP).** Plusieurs zones contenant des micro-anévrismes peuvent être vues (flèches noires) avec une zone de néovascularisation du disque optique (flèches jaunes) et des exsudats (flèches blanches) supérotemporal à la fovéa. **Image C. Angiographie à la fluorescéine du patient vu dans l'image B.** Des zones de non-perfusion profondes de la rétine sont identifiées par un astérisque. De nombreux points blancs (flèches blanches) indiquent la présence de micro-anévrismes, facilement visualisés sur angiographies à la fluorescéine. **Image D. Microvaisseaux rétiens isolés, d'un patient diabétique,** démontrant de nombreux microanévrismes capillaires (flèches épaisses) et des capillaires dégénérés (flèches minces).

I.2.1. Stades précoces de la rétinopathie diabétique non proliférative (RDNP)

Les patients atteints d'une rétinopathie diabétique au stade précoce ont généralement des micro-anévrismes rétiens, qui apparaissent comme des points rouges sur l'examen du

fond d'œil. Ces micro-anévrysmes sont des dilatations localisées de la microvascularisation qui se sont développées en raison de faiblesses localisées dans la paroi des vaisseaux. (Kern, 2007).

Les changements au cours de l'étape de rétinopathie non-proliférative ont rarement une signification clinique, mais une augmentation aggravante de leur présence a tendance à prédire la progression vers les stades les plus avancés et cliniquement significatifs de la maladie. (Crawford *et al.*, 2009).

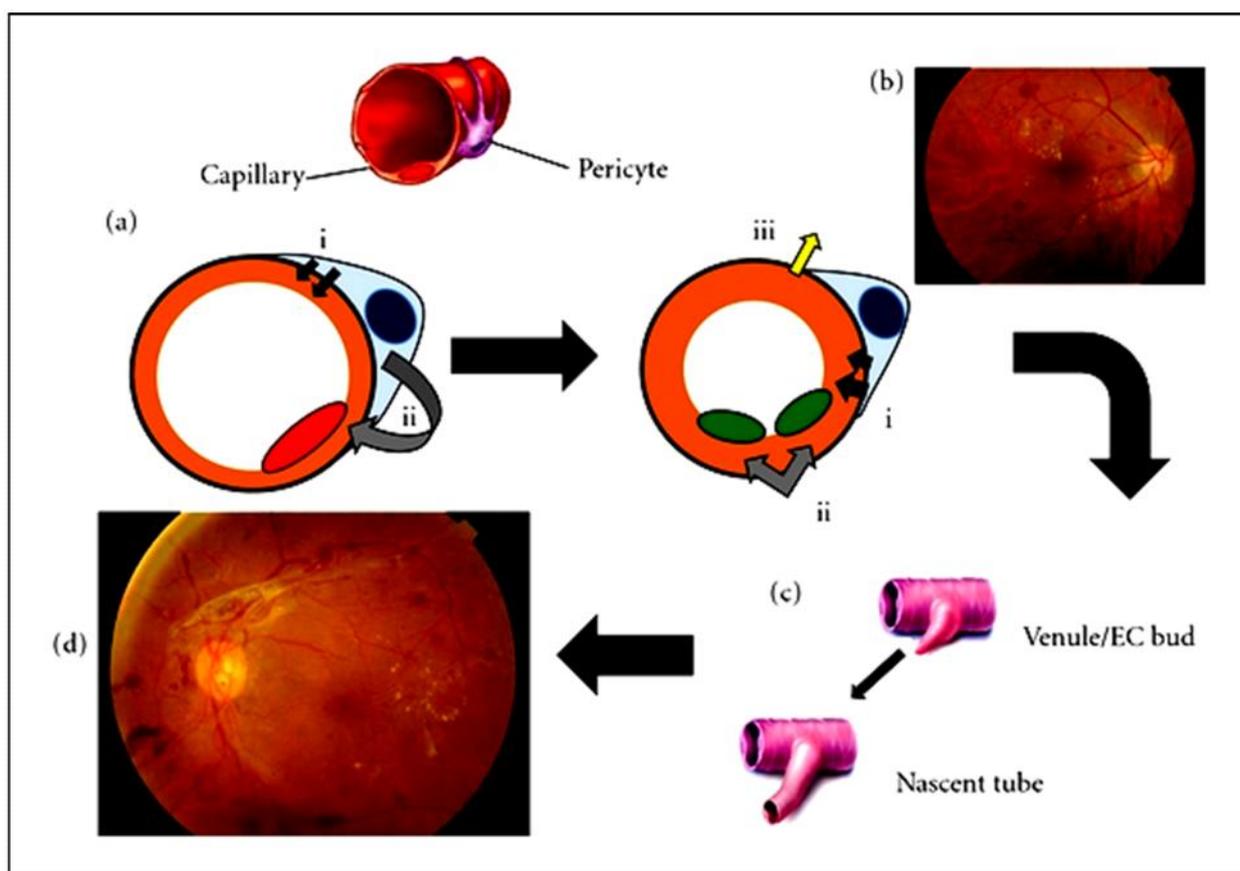


Figure 2: Représentation schématique de la progression de la rétinopathie diabétique.

Les péricytes interagissent directement avec l'endothélium capillaire de la rétine normale (a) au sein de la membrane basale par des contacts étroits et des jonctions lacunaires assurant un tonus de base a (i) et un arrêt de la croissance a (ii). Une hyperglycémie persistante conduit à l'induction de la contraction des péricytes b (i) provoquant la croissance des cellules endothéliales b (ii) et perturbant les contacts de la matrice b (iii) en l'absence de péricyte. Un épaissement de la membrane, et des capillaires étroits contribuent à une thrombose, une ischémie, et les premières anomalies détectables de la RDNP. En réponse à l'hypoxie résultante, des médiateurs solubles de l'angiogenèse, tels que le VEGF, sont libérés pour

développer un apport de nutriments par la formation de tubes capillaires naissants (c). Ces nouveaux vaisseaux sanguins sont hautement perméables et fragiles et sont facilement perturbés, provoquant des hémorragies et une perte de la vision caractéristique de la RDP (d). (Crawford *et al.*, 2009).

I.2.2. Stades avancés de la rétinopathie diabétique (rétinopathie diabétique proliférative (RDP))

La RDP est mise en évidence par la présence de nouveaux vaisseaux sanguins sur la surface du disque optique de la rétine conjuguée à une ischémie rétinienne. (Mohamed *et al.*, 2007). Ces nouveaux vaisseaux sanguins deviennent problématiques parce qu'ils sont fragiles et très perméables. Ils percent le disque optique et poussent le long de la surface de la rétine et dans l'échafaudage de la face postérieure de la hyaloïde. Les vaisseaux eux-mêmes ne nuisent pas à la vision, mais sont perturbés facilement par la traction du vitré et provoquent une hémorragie dans la cavité vitréenne ou dans l'espace prérétinien. (Crawford *et al.*, 2009). La néovascularisation est également associée à une composante fibreuse qui, une fois contracté, peut conduire à un décollement de la rétine. Cette étape de la RDP est la plus grande menace à la perte de vision. La figure 2 montre la représentation schématique de la progression de la rétinopathie diabétique. (Tang et Kern, 2011)

Ces deux grandes phases cliniques (stades d'évolution) sont séparées par une phase charnière intermédiaires dite « pré-proliférative », 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.3. PATHOGENESE DE LA REDINOPATHIE DIABETIQUE

La pathogenèse exacte de la rétinopathie diabétique reste encore inconnue. Cependant, à l'heure actuelle, plusieurs mécanismes physiopathologiques ont été proposés pour expliquer les effets toxiques du glucose sur la paroi vasculaire. Ces différentes hypothèses interviennent probablement toutes de manière liée dans la genèse de la maladie. On distingue, l'hypothèse hémodynamique et les hypothèses biochimiques. Parmi ces dernières, certaines concernent des changements aigus et répétés du métabolisme du glucose (voie des polyols et de

l'hexosamine, activation de la protéine kinase C), (**Smardo et al., 1992**), tandis que d'autres concernent des changements à long terme et cumulatifs (formation des produits avancés de glycation (AGEs), stress oxydant) (**Wolff et Dean, 1987**).

Au cours des dernières décennies, l'hyperglycémie a été considérée comme le principal contributeur et inducteur dans la progression de la maladie. (**Yan-Ming Sun et al., 2013**) Les essais cliniques de « UK Prospective Diabetes Study ; UKPDS » et du « Diabetes Control and Complications Trial ; DCCT » ont confirmé la forte relation entre l'hyperglycémie chronique, le développement de la RD et sa progression, mais le mécanisme sous-jacent qui conduit au développement de lésions microvasculaires comme résultat de l'hyperglycémie, reste incertain. (**Matthews et al., 2004 ; White et al., 2001**).

I.4. TRAITEMENTS DE LA RETINOPATHIE DIABETIQUE

Plusieurs approches thérapeutiques sont utilisées cliniquement pour inhiber le développement de la rétinopathie. Les premiers stades de la rétinopathie peuvent être réduits par une intervention agressive pour contrôler l'hyperglycémie (**DCCT, 1993; UKPDS, 1998**), la pression artérielle et le métabolisme des lipides (**Chaturvedi et al., 1998; Mauer et al., 2009; UKPDS, 1998**). Malheureusement, le maintien du contrôle métabolique normal a été très difficile à accomplir pour de nombreux patients diabétiques.

Les traitements destinés à inhiber les stades avancés de la rétinopathie comprennent le laser et la vitrectomie, les thérapies anti-VEGF, et les stéroïdes. Lorsqu'ils sont utilisés de manière appropriée et en temps opportun, le laser et la vitrectomie aident à réduire le risque catastrophique de perte de la vision liés à la RD (**La rétinopathie diabétique Study Research Group, 1981**), bien que la thérapie au laser présente un risque destructeur.

Compte tenu des limitations et des effets secondaires des traitements actuels de la rétinopathie diabétique, il est important de comprendre les mécanismes moléculaires qui contribuent aux changements précoces observés dans les rétines des diabétiques. (**Tang et Kern, 2011**).

II. SYSTEME VASCULAIRE ET ANGIOGENESE

II.1. RESEAU VASCULAIRE

Le réseau vasculaire est composé de vaisseaux sanguins qui forment un circuit fermé d'artères et de veines. La principale fonction du système vasculaire est d'assurer la circulation du sang à travers l'organisme via le cœur. Il est composé de trois types de vaisseaux sanguins : les artères et veines, les artérioles et veinules et enfin les capillaires. (Figure 3). (Jain, 2003 ; Cleaver et Melton, 2003).

II.1.1. Structure des micro-vaisseaux

Les capillaires sont les vaisseaux les plus fins du système artériel (le diamètre de leur lumière est de 5 à 8 μm et celui des couches cellulaires de 1 μm). Ils sont constitués uniquement d'une couche de cellules endothéliales recouverte de quelques péricytes associés à la membrane basale vasculaire elle-même composée essentiellement de collagène IV (figure 3C) (Carl *et al.*, 2009).

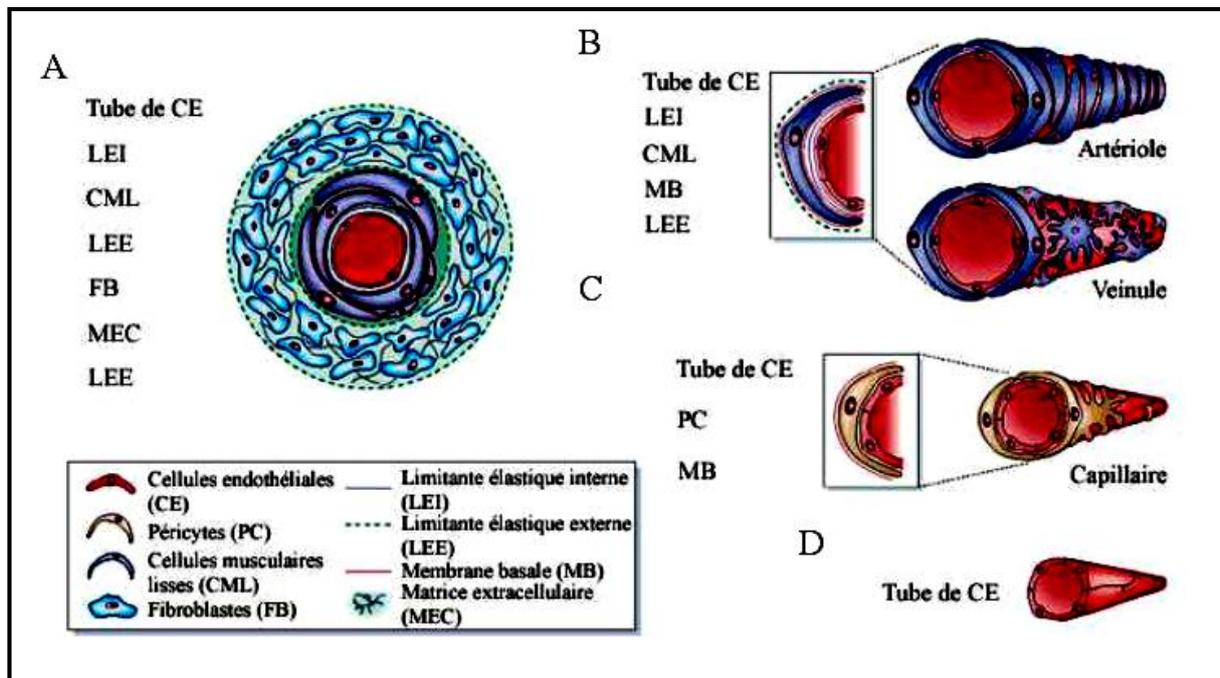


Figure 3 : Structure des différents types de vaisseaux sanguins. (Modifiée d'après Jain, Nat. 2003).

(A) Vaisseau sanguin, (B) Artériole ou veinule, (C) Capillaire, (D) Tube de cellules endothéliales.

Lors de la ramification des artérioles et veinules en capillaires, les cellules musculaires lisses qui les composent sont remplacées par les péricytes, qui ont la même origine ontogénique. Les vaisseaux sanguins immatures, formés lors de la vasculogenèse, sont quant à eux uniquement composés d'un tube formé par les cellules endothéliales (**figure 3D**).

II.1.2. Microvaisseaux au sein de l'œil

II.1.2.1. Anatomie du globe oculaire

La paroi du globe oculaire est formée de 3 *tuniques* :

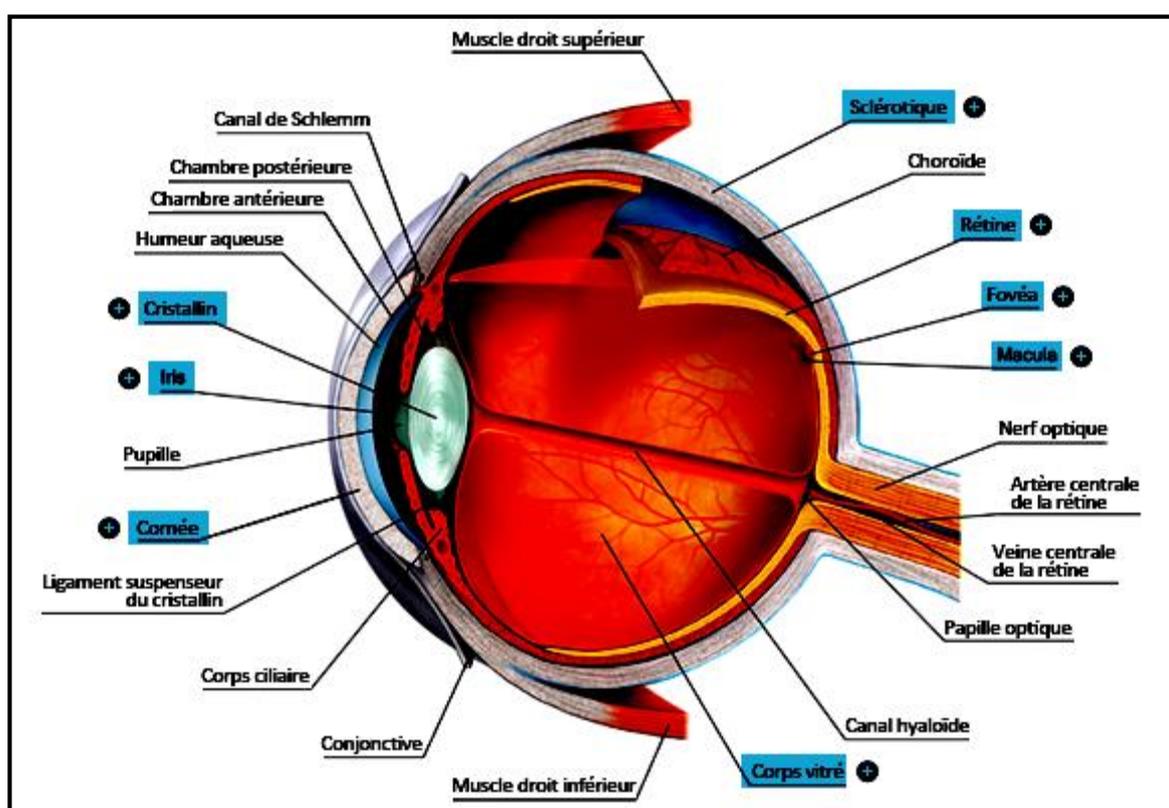


Figure 4 : Anatomie de l'œil humain. (Bernard, 2007)

- a- **Tunique fibreuse**, externe, se compose de la sclérotique opaque en arrière et de la cornée transparente en avant.
- b- **Tunique uvéale**, dite aussi uvée, se compose de trois éléments : l'iris en avant, le corps ciliaire et la choroïde en arrière.
- c- **Tunique nerveuse**, couche la plus interne constituant la rétine, 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.

II.1.2.2. Rétine

La rétine visuelle est composée de deux feuillets, un feuillet externe pigmenté et un feuillet interne neuro-sensoriel (**Stewart et Ramon, 2001**).

✓ Feuillet externe

Le feuillet externe de la rétine (ou rétine pigmentaire) 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.

✓ Feuillet interne

La structure réceptrice de la lumière est contenue dans le feuillet interne (ou rétine neuro-sensorielle) de la rétine. Ce feuillet est composé de sept couches successives adossées à l'épithélium pigmentaire. (**Fig.5**)

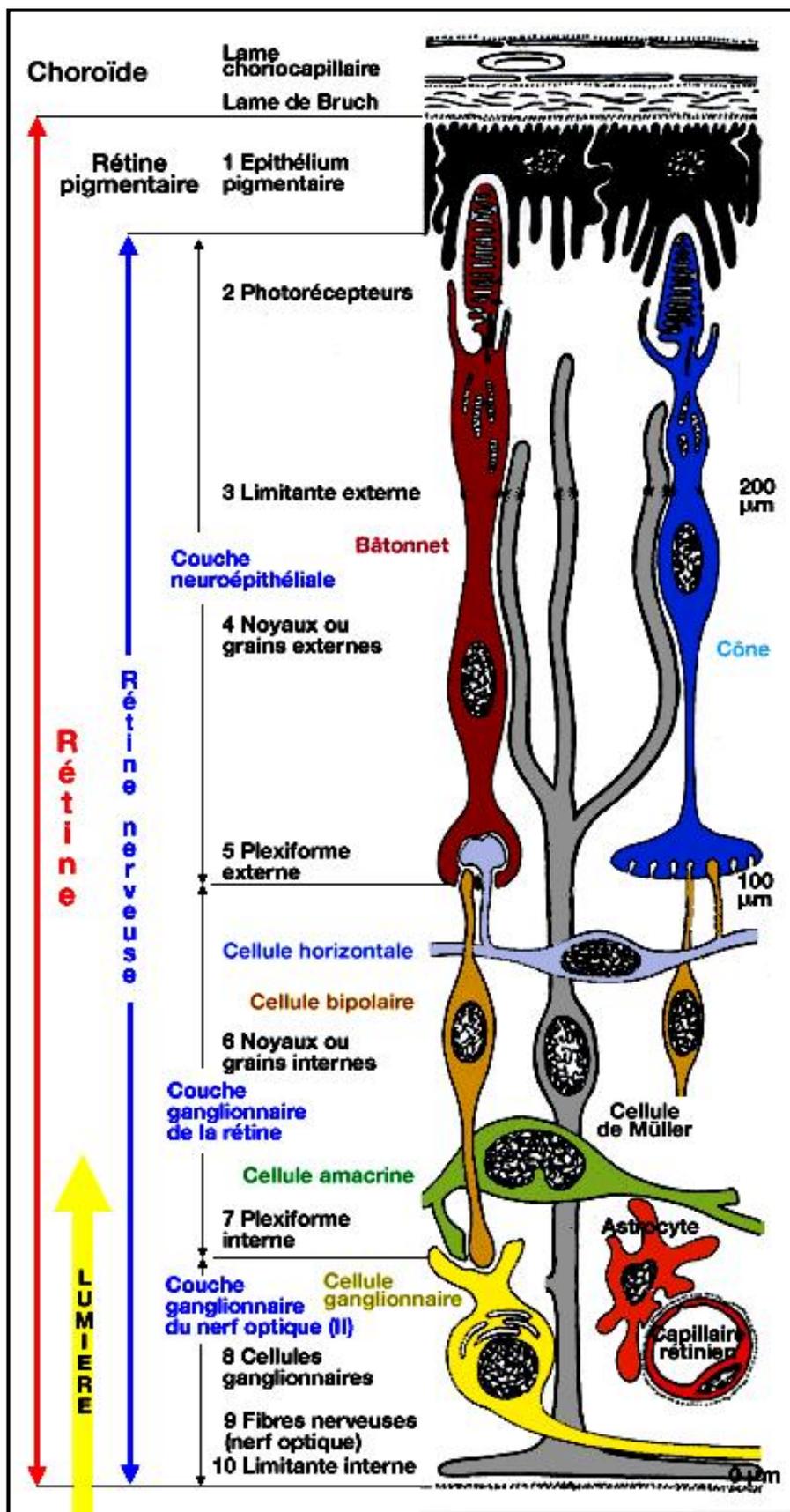


Figure 5 : Structure de la rétine (Renard *et al.*, 1982)

II.1.2.3. Vascularisation rétinienne

La rétine est un tissu particulièrement irriguée 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 (**Pournaras, 2008**).

Les cellules endothéliales, en plus des péricytes et cellules de Müller, participent à la formation et à la fonction des barrières hémato-réiniennes (BHR), on en distingue deux : BHR interne et externe, rendues étanches par l'existence de jonctions serrées entourant les cellules de l'endothélium responsable de la perméabilité capillaire et le 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 (**Friedlander, 2007; Mendes-Jorge, 2009**).

II.2. ENDOTHELIUM VASCULAIRE

II.2.1. Structure et propriétés de l'endothélium

L'endothélium est constitué d'une couche monocellulaire de cellules épithéliales pavimenteuses qui tapissent la surface de tout le système cardiovasculaire. Il représente près de 1 à 2 % de la masse corporelle totale (**Huttner et al., 1983**). Occupant une position stratégique à l'interface entre le sang et les tissus, l'endothélium n'est pas une simple barrière inerte mais un organe dynamique qui possède une grande variété de fonctions (**Plutzky et al., 2003**).

II.2.2. Fonctions de l'endothélium

L'endothélium est un organe endocrine 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 assure de très nombreuses fonctions : fonction de régulation du tonus vasomoteur, de contrôle de la vasoperméabilité et de l'extravasation des éléments figurés du sang, fonctions anti-athérogènes, anti-thrombogènes et anti-adhésives. D'autre part l'endothélium contrôle la prolifération des cellules musculaires lisses mais aussi sa propre

angiogénèse. Il réagit aux modifications chimiques, physiques et humorales qui surviennent dans son environnement par la synthèse et la libération de nombreux facteurs impliqués dans la modulation de l'angiogénèse, l'inflammation, l'hémostase, la vasomotricité et la perméabilité vasculaire (**Féléto et al., 2006**). Il contribue ainsi de façon majeure à l'homéostasie du système cardiovasculaire (**Lüscher et Noll, 1995 ; Davignon et al., 2004**).

II.2.3. Jonctions endothéliales

Les jonctions intercellulaires constituent les points d'ancrage des cellules endothéliales entre elles (**Broman et al., 2006; Carmeliet et al., 1999; Dejana, 2004; Esser et al., 1998; Grazia Lampugnani et al., 2003 ; Gavard and Gutkind, 2006**). Ces jonctions qui maintiennent jointives les cellules assurent la fonction de barrière de l'endothélium. Elles n'ont pas uniquement un rôle architectural, mais constituent également des structures permettant la transmission de signaux qui régulent des phénomènes tels que la perméabilité vasculaire, l'inhibition de contact ou l'apoptose. Elles 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 adhaerens, les jonctions communicantes, les jonctions serrées, et les jonctions adhérentes, toutes décrites ci-après.

▪ **Complexus adhaerens**

Il s'agit de structures apparentées aux desmosomes. 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 (**Dejana, 2004; Zhou et al., 2004**).

▪ **Jonctions communicantes**

Les jonctions communicantes, comme leur nom l'indique, autorisent une communication directe entre cellules adjacentes en formant des conduits au travers desquels peut avoir lieu l'échange de métabolites, d'ions et de petites molécules de signalisation de masse inférieure à 1 kDa (**Sohl et Willecke, 2004**). Ces structures sont présentes dans toutes les cellules de tous les vaisseaux sanguins. (**Figuerola et al., 2006; Saez et al., 2003**).

- **Jonctions serrées (zonula occludens)**

Les jonctions serrées constituent des structures jonctionnelles impliquées dans la régulation de la perméabilité. Elles délimitent le domaine apical du domaine basolatéral membranaire, bien que cette distinction soit mal aisée à établir dans l'endothélium vasculaire, étant donné la proximité des protéines impliquées à la fois dans l'architecture des jonctions adhérentes et serrées (**Bazzoni et Dejana, 2004**).

- **Jonctions adhérentes**

Les jonctions adhérentes sont présentes dans tout le système vasculaire (**Dejana, 2004**). La protéine majeure de ces jonctions est la VE-cadhérine. En association avec ses partenaires cytoplasmiques qui la relie aux différents types de cytosquelette, elle élabore des jonctions solides et cohésives. Leur ouverture finement régulée permet à l'endothélium d'assurer sa fonction de barrière semi-perméable. (**Perez-Moreno et Fuchs, 2006**).

- ✓ **VE-cadhérine (Vascular Endothelial-cadherin, cadhérine 5 ou CD144)**

La cadhérine endothéliale vasculaire ou VE-cadhérine est une cadhérine classique de type II. C'est une protéine adhésive majoritaire de la jonction adhérente endothéliale. Elle intervient à différents niveaux en biologie vasculaire (**Nollet et al., 2000**).

En 1997, Vittet et collaborateurs ont montré l'importance de la VE-cadhérine dans l'angiogenèse par des expériences d'inactivation de son gène dans des cellules souches embryonnaires. L'invalidation génique de la VE-cadhérine a donc permis de mettre en évidence son rôle primordial dans la morphogenèse vasculaire et l'intégrité de l'endothélium.

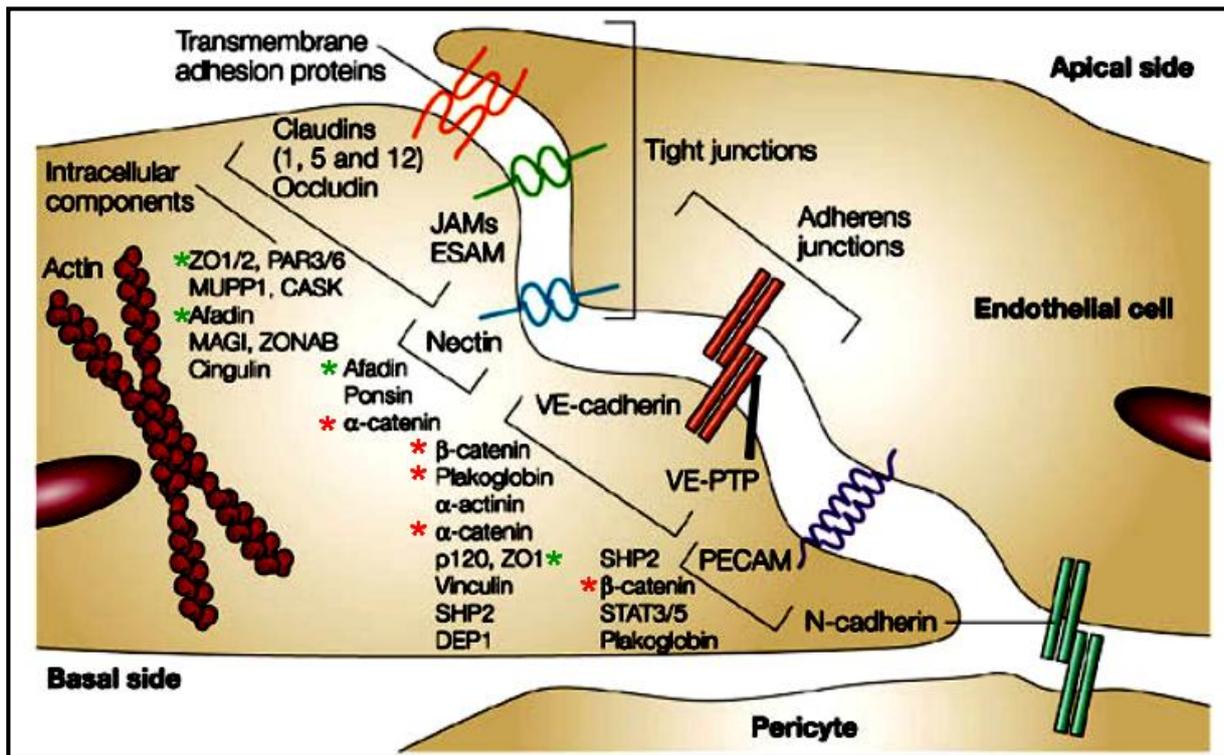


Figure 6 : Diagramme de l'organisation moléculaire des jonctions endothéliales et de leur entrelacement. **D'après (Dejana, 2004).**

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

▪ 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 composants des autres structures.

✓ Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1/CD31)

La molécule d'adhésion PECAM-1 est une protéine qui appartient à la superfamille des Immunoglobuline. Elle s'exprime très précocement durant le développement embryonnaire, et se maintient jusqu'à l'âge adulte dans toutes les cellules endothéliales. Son expression est restreinte aux cellules du système vasculaire, ainsi qu'aux plaquettes, monocytes, neutrophiles, et à certains lymphocytes T (**Ilan et Madri, 2003**).

- **Fonctions de la PECAM-1/CD31**

- **Adhésion cellule-cellule**

Le rôle de la PECAM-1 dans l'adhésion cellule-cellule a été découvert en 1990 (**Albelda et al., 1990**). En effet, au niveau des cellules endothéliales (CE), la PECAM-1 est localisée généralement à des sites de contact cellule-cellule (**Sun et al., 1996**). En outre, la PECAM-1 a des propriétés qui lui permettent de réguler les interactions entre les CE, au cours de l'angiogenèse et les interactions entre CE-leucocytes durant l'inflammation.

- **Migration cellulaire**

En 1992, un lien a été établi entre la PECAM-1 et la migration cellulaire (**Schimmenti et al., 1992**). Une preuve supplémentaire du rôle de PECAM-1 dans l'adhésion et la migration des CE vient de l'observation de l'interaction de la PECAM-1 avec plusieurs protéines de jonction d'adhérence de la famille des caténine. La PECAM-1 peut réguler les niveaux de phosphorylation de la tyrosine des caténines pour contrôler la localisation et l'activité intracellulaire de la -caténine et empêcher sa translocation nucléaire (**Ilan et al., 1990**).

SECTION III : DEVELOPPEMENT VASCULAIRE ET ANGIOGENESE

III.1. DEVELOPPEMENT VASCULAIRE

Le système cardiovasculaire est le premier organe fonctionnel qui se développe chez l'embryon vertébré et qui est nécessaire à sa survie. Il a évolué pour assurer l'entretien de la fonction d'échange gazeux, d'apport nutritifs et d'enlèvement de déchets métaboliques et contribue au contrôle de la température et de la vasodilatation. Plusieurs mécanismes génétiques et épigénétiques sont impliqués dans le développement primitif du système vasculaire. Les événements coordonnés de l'activation des cellules endothéliales conduisant à leur

prolifération, migration, alignement, formation de tubes, branchement et anastomoses sont collectivement appelés morphogenèse vasculaire et nécessite deux processus successifs : la vasculogenèse et l'angiogenèse (**Risau, 1997**).

II.1.1. De la vasculogenèse à l'angiogenèse

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. Ce phénomène intervient précocement et est limité dans le temps au cours du développement embryonnaire (**Ferguson et al., 2005**). Le développement du système vasculaire embryonnaire est régulé par des facteurs solubles, dont un facteur de croissance spécifique de l'endothélium vasculaire, le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (**Ferguson et al., 2005**), qui s'avère primordial pour le développement de l'embryon, et son absence est létal, comme l'atteste les modèles de souris transgéniques (**Byrne et al., 2005; Ferrara et al., 1996**).

III.2. ANGIOGENESE

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 est rare durant la vie d'adulte car la plupart des vaisseaux sanguins restent quiescents (seulement 0,01% des cellules endothéliales sont en division). Toutefois, l'angiogenèse se déroule physiologiquement au cours du cycle menstruel féminin, pendant la gestation au niveau de la glande mammaire et du placenta... Elle a également lieu au cours de l'inflammation, des processus de réparation tissulaire, et d'ischémie tissulaire... C'est un mécanisme indispensable et hautement régulé dans les conditions physiologiques (**Couffinhal et al., 2001 ; Carmeliet, 2000**).

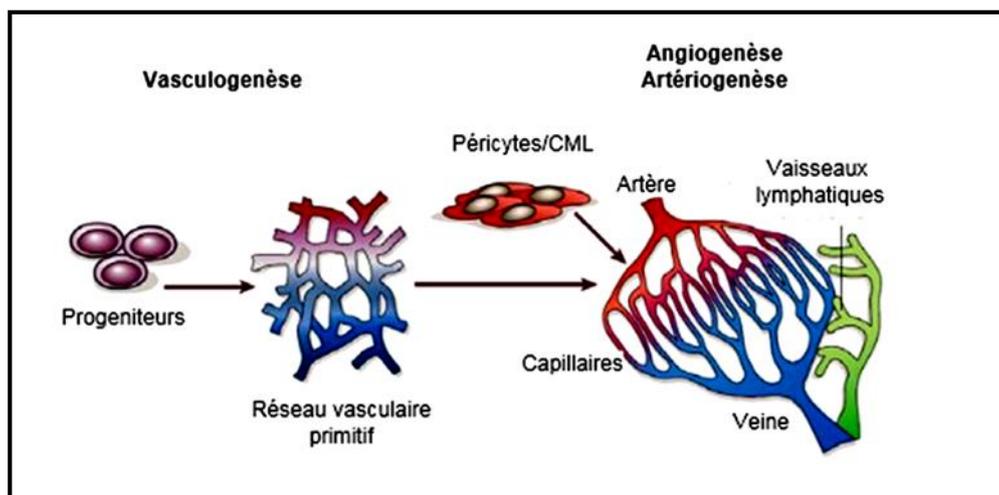


Figure 7 : Vasculogénèse, angiogénèse et artériogénèse. (Carmeliet, 2005)

Dans l'embryon, les cellules progénitrices endothéliales (angioblastes) s'assemblent en un réseau primitif (vasculogénèse), qui se développe et se remodèle (angiogénèse). Les cellules musculaires lisses (CML) couvrent les cellules endothéliales pendant la myogénèse vasculaire et stabilisent les vaisseaux durant l'artériogénèse (Carmeliet, 2005). Enfin, durant l'étape finale d'« artériogénèse », les vaisseaux se recouvrent d'une couche musculaire leur permettant d'acquérir les propriétés viscoélastiques et les propriétés vasomotrices nécessaires à l'adaptation du vaisseau à la perfusion tissulaire. (Heil et Schaper, 2007).

III.2.1. Mécanismes moléculaires de l'angiogénèse

L'initiation du phénomène d'angiogénèse nécessite une modification du phénotype des cellules endothéliales sous l'effet d'une stimulation. Celle-ci peut être physiologique, comme l'hypoxie qui entraîne la sécrétion d'un facteur mitogénique puissant appelé VEGF (vascular endothelial growth factor), ou inflammatoire après une lésion ou une infection, ou encore associée à la présence d'une tumeur invasive. L'hypoxie est souvent le stimulus initial qui enclenche la production d'une cascade de médiateurs pro et anti-angiogéniques (Gerber *et al.*, 1999).

La formation d'un nouveau vaisseau se divise en plusieurs phases : les étapes initiales comprennent la vasodilatation du vaisseau parental ce qui réduit la cohésion entre cellules endothéliales adjacentes, la dégradation de la membrane basale et du conjonctif adjacent par des protéases, ainsi que par les activateurs du plasminogène. Les vaisseaux sont ensuite

déstabilisés sous l'action de l'angiopoïétine-2, ligand du récepteur Tie-2 et ainsi antagoniste naturel de l'angiopoïétine-1 (Gerber *et al.*, 1999).

Vient ensuite une phase de migration des cellules endothéliales, de prolifération, d'élongation et de mitose, puis celle d'assemblage en tubules pour parvenir au bourgeonnement du capillaire. La dernière étape consiste en la stabilisation des vaisseaux pendant, ce qu'on appelle la phase de maturation : il s'agit du recrutement de péricytes et de cellules musculaires lisses, ainsi que la formation d'une nouvelle membrane basale, processus impliquant le platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB), l'angiopoïétine-1 et le Transforming Growth Factor- (TGF) (Gerber *et al.*, 1999).

Certains vaisseaux, une minorité, vont encore évoluer en augmentant leur diamètre et l'épaisseur de leur paroi. A ce stade, ils sont encore très dépendants de la présence de facteurs comme le VEGF : le réseau peut encore régresser complètement en son absence. Si le vaisseau ne régresse pas, il s'implante définitivement et la machinerie de l'angiogenèse s'éteint. (Gerber *et al.*, 1999).

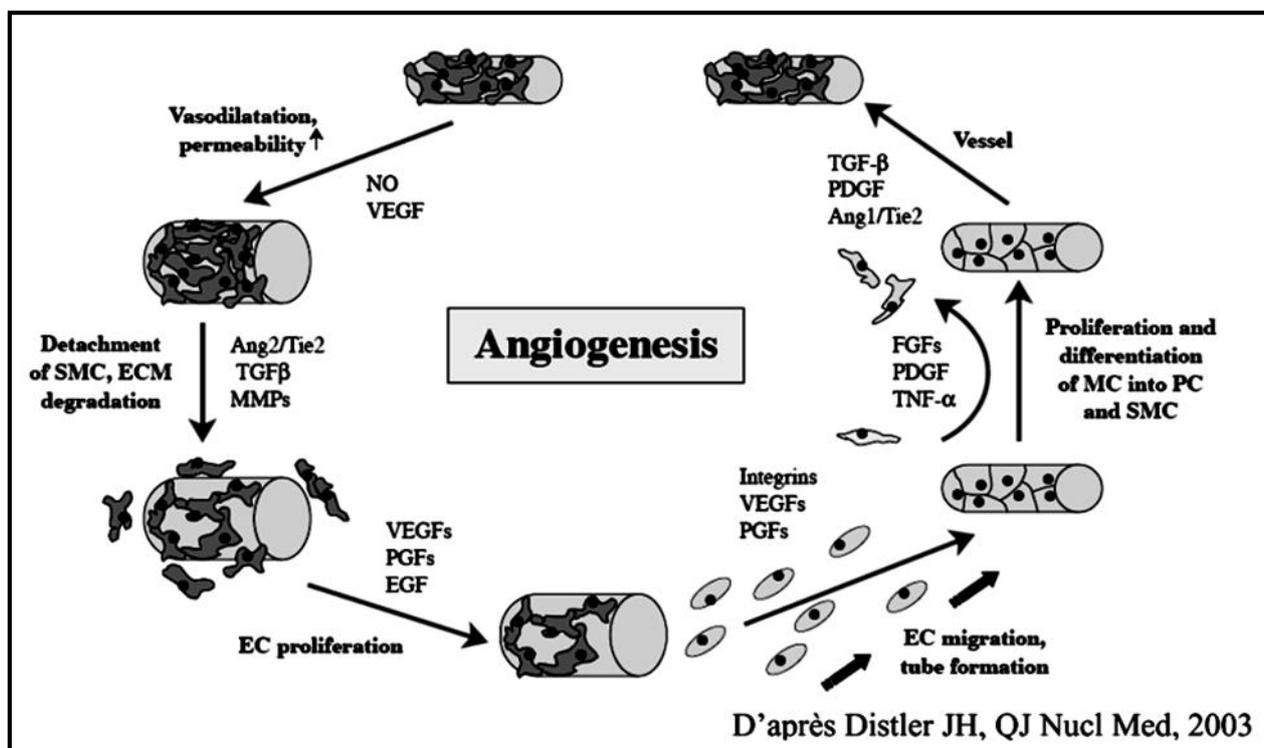


Figure 8 : Différentes étapes de l'angiogenèse. (Gerber *et al.*, 1999)

EC: Endothelial cell; SMC: Smooth Muscle Cell; PC: Pericyte ECM : Extracellular Matrix

III.2.2. Régulations de l'angiogénèse

Les facteurs endogènes pro- et anti-angiogéniques (figure 9) sont de différentes natures : facteurs de croissance, cytokines, protéases, ou dérivés du clivage de la matrice extracellulaire. (Bergers et Benjamin, 2003)

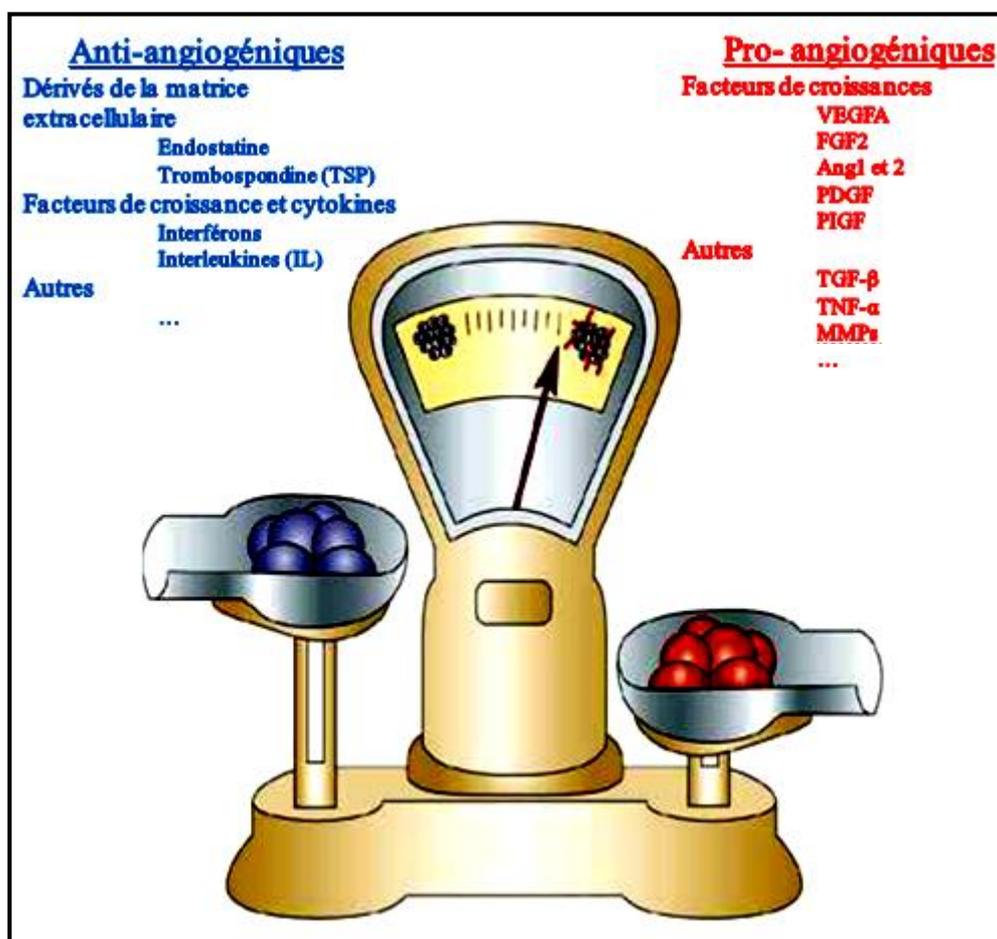


Figure 9 : Représentation schématique des facteurs endogènes angiogéniques et angiostatiques. (Bergers et Benjamin, 2003)

La plupart des agents anti-angiogéniques endogènes sont des fragments issus de la dégradation de la matrice extracellulaire tels que l'endostatine issu du clivage du collagène XVIII, ou encore les thrombospondines (TSPs) qui sont des glycoprotéines de la matrice extracellulaire. D'autres molécules sont issues du clivage de protéines ayant d'autres fonctions (l'angiostatine est un dérivé du plasminogène), ou sécrétées par des cellules

inflammatoires (Interleukines), ou impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire elle-même (thrombospondines). **(Bergers et Benjamin, 2003)**

Les agents pro-angiogéniques sont quant à eux habituellement des facteurs de croissance essentiellement impliqués lors du développement embryonnaire (VEGFA, FGF2, PIFG, PDGF, etc...) mais jouant aussi un rôle physiologique dans l'homéostasie à l'âge adulte. **(Bergers et Benjamin, 2003)**

✓ **Le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) et ses récepteurs**

La famille des VEGF est composée de sept membres (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGFD, VEGF-E et VEGF-F et le PlGF : Placenta-like Growth Factor. Ils forment des dimères de glycoprotéines biologiquement actifs qui ont en commun un domaine d'homologie mais qui présentent différentes spécificités d'interaction avec trois récepteurs à activité tyrosine kinase (VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3) et deux récepteurs de basse affinité, les neuropilines (Np1 et Np2).

Ces protéines jouent un rôle important dans la physiologie du système vasculaire, incluant la vasculogénèse, l'hématopoïèse, l'angiogénèse et la lymphangiogénèse. **(Roskoski, 2007).**

Le VEGF-A et ses récepteurs sont les mieux caractérisés dans les voies de signalisation du développement angiogénique. Le VEGF-A est un facteur de croissance ayant comme cible principale la cellule endothéliale. La perte d'un seul allèle du VEGF-A résulte en une létalité embryonnaire démontrant le rôle clef du VEGF dans l'angiogénèse **(Carmeliet et al., 1996 ; Ferrara et al., 1996)**. Deux autres membres de la famille VEGF ont un rôle important dans l'angiogénèse et la lymphangiogénèse: il s'agit du VEGF-C et du VEGF-D. **(Fergelot et al., 2005 ; Roskoski, 2007).**

L'expression du VEGF est induite par de nombreux facteurs de croissance et cytokines, mais le stimulus le plus puissant reste l'hypoxie **(Fergelot et al., 2005 ; Roskoski, 2007).**

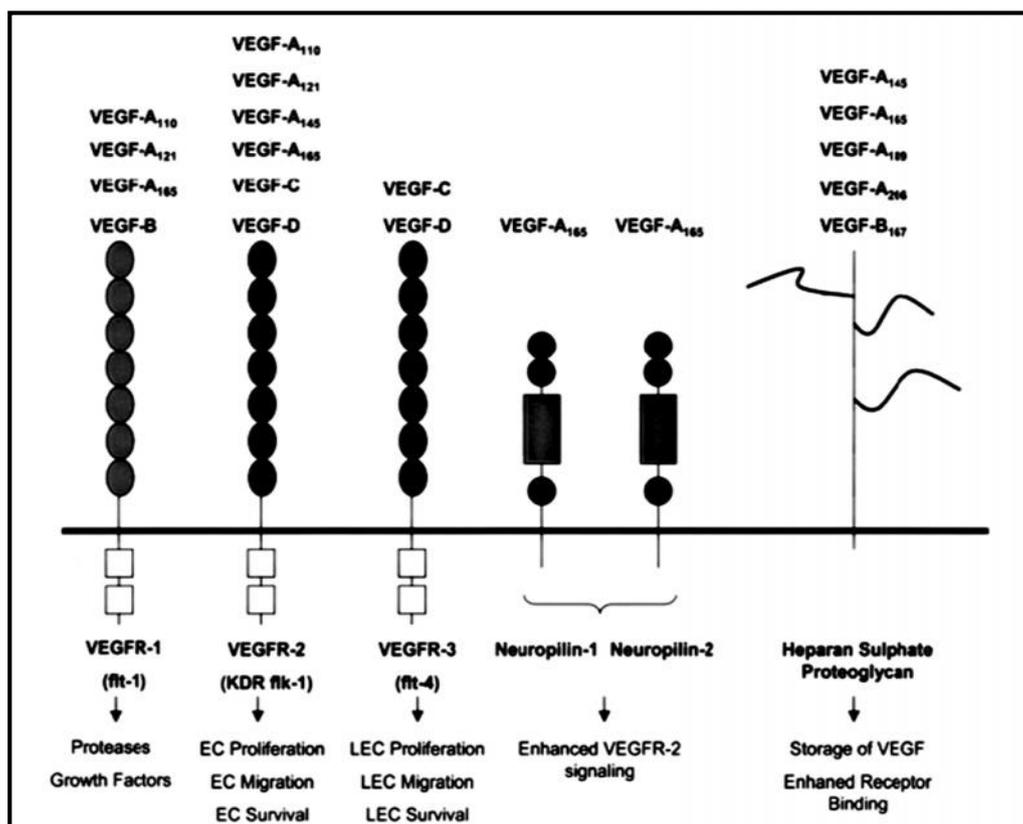


Figure 10: VEGF, ses récepteurs et leurs effets biologiques (Ann Hoeben *et al.*, 2004).

III.3. ANGIOGENESE PATHOLOGIQUE

III.3.1. Généralités

Le réseau vasculaire est le résultat de l'équilibre entre signaux pro-et anti-angiogéniques. Une dérégulation de cette balance peut entraîner un excès ou au contraire un défaut de vascularisation et ainsi favoriser la progression de nombreuses pathologies. Parmi les pathologies les plus connues où survient un excès d'angiogenèse, on trouve les rétinopathies, l'arthrite rhumatoïde, l'athérosclérose, le cancer ou encore le psoriasis. (Carmeliet, 2005).

III.3.2. Processus moléculaire et cellulaire de la re-vascularisation post-rétinopathie diabétique

En réponse à une occlusion vasculaire, la néovascularisation a lieu essentiellement par les processus d'angiogenèse qui est principalement activée par l'inflammation et l'hypoxie (Deindl, 2001)

La néoangiogenèse (néovascularisation) rétinienne peut être considérée comme le résultat d'une série de phénomènes biologiques, et se divise en quatre phases successives :

a- La modification de l'endothélium et de la membrane basale :

Les premières anomalies visibles au niveau des zones d'ischémie sont une activité anormale des cellules endothéliales, associée à des ruptures localisées de la membrane basale sous l'action d'enzymes protéolytiques, notamment l'activateur de plasminogène et la collagénase de type IV. (Folkman *et al.*, 1992).

b- La migration des cellules endothéliales et des cellules gliales

A la suite de la dégradation de la membrane basale les cellules endothéliales migrent dans les tissus environnants pouvant induire la formation des néovaisseaux, parallèlement les cellules gliales rétiniennes franchissent la limitante interne et forment à sa surface une fine membrane épitréiniennne qui peut se détacher partiellement de la rétine, laissant d'autres cellules gliales reformer des couches cellulaires successives (Folkman *et al.*, 1992). Ce plan de cellules gliales peut servir de surface d'adhésion et de migration pour les cellules endothéliales.

c- La prolifération des cellules endothéliales

Elle pourrait être favorisée par la dégénérescence des péricytes qui apparaît précocement au cours de la rétinopathie diabétique, cette prolifération ne débute qu'après la rupture de la continuité de la paroi capillaire et la migration des cellules endothéliales. Les cellules endothéliales vasculaires synthétisent des facteurs de croissances nécessaires à leur

multiplication. Avec l'accroissement de la population endothéliale, ces facteurs vont rapidement s'accumuler dans le milieu et stimuler de manière exponentielle le processus prolifératif selon un mode autocrine (**Riseau, 1997**).



Figure 11 : Photographie du fond d'œil qui montre une hémorragie en forme de bateau dans l'œil gauche, avec néovascularisation émanant du disque optique (**Crawford *et al.*, 2009**).

d- La constitution des néocapillaires

La multiplication des cellules endothéliales est secondairement complétée par une organisation fibreuse de la paroi néoformée, par migration et prolifération des fibroblastes et des cellules gliales. Les cellules endothéliales s'entourent d'une membrane basale composée de collagène de type IV, de laminine et de protéoglycanes, qui au début laissent la paroi relativement perméable. C'est à ce stade que se produisent des hémorragies intravitréennes d'abondance variable (**Hirschi et D'Amore, 1996**).

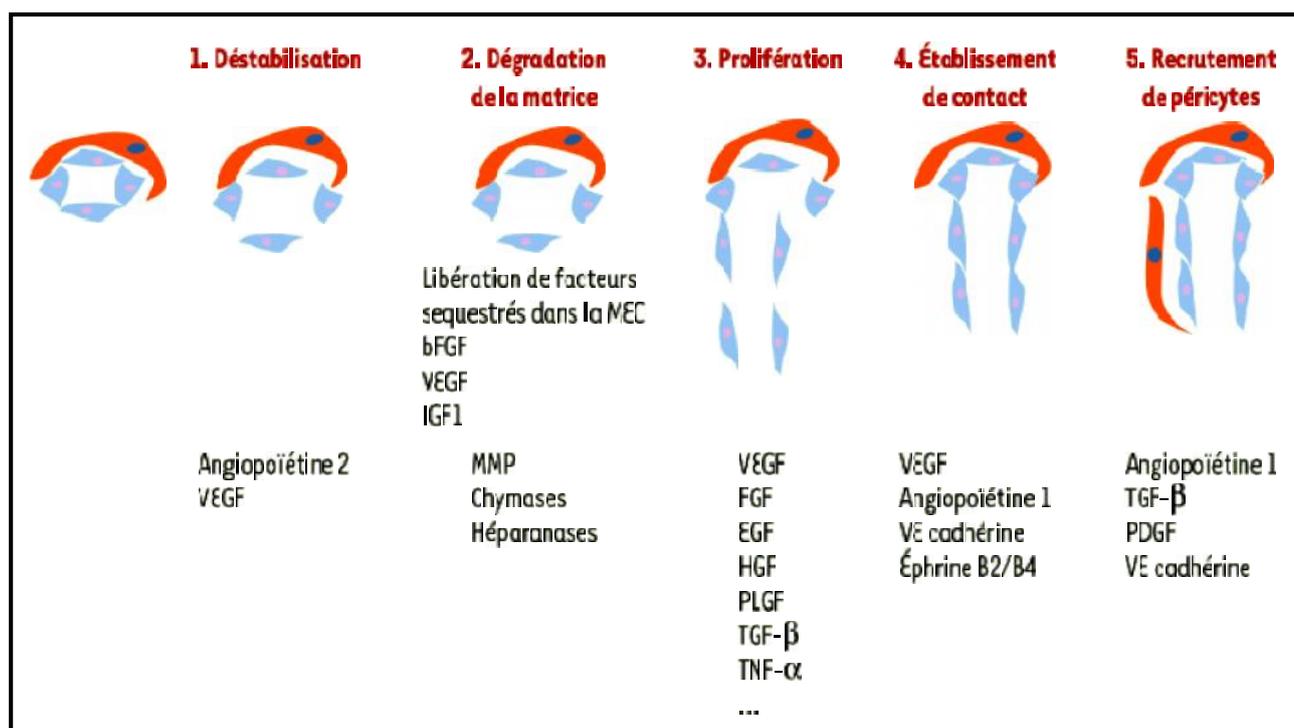


Figure 12 : Étapes de l'angiogenèse et principaux facteurs de croissance impliqués. La figure schématise les principales étapes de l'angiogenèse; sous chaque étape sont indiqués les principaux facteurs impliqués. EGF: epithelial growth factor; bFGF: basic fibroblast growth factor; HGF: hepatocyte growth factor; IGF1: insulin-like growth factor1; MMP: métalloprotéases de la matrice extracellulaire; PDGF: platelet derived growth factor; PLGF: placental growth factor; TGF- β : transforming growth factor ; TNF : tumor necrosis factor ; VEGF: vascular endothelial growth factor (Carmeliet, 2000)

III.3.3 Inflammation et rétinopathie diabétique

➤ Au cours du stade précoce

On a constaté qu'une variété d'anomalies physiologiques et moléculaires qui sont compatibles avec l'inflammation sont augmentées dans les rétines ou l'humeur vitrée des patients et animaux diabétiques. (Powell et Field, 1964). Ces changements pro-inflammatoires sont compatibles avec la voie immunitaire innée (Adamis et Berman, 2008; Kaul et al., 2010; Kern, 2007). Beaucoup de ces changements inflammatoires semblent importants dans le développement de la rétinopathie diabétique. Notre compréhension actuelle

du rôle des processus inflammatoires dans la pathogenèse de la rétinopathie diabétique est à un stade précoce, et doit être élargie.

➤ **Au cours du stade avancé, prolifératif**

La signature moléculaire de l'inflammation est la production de cytokines pro-inflammatoires qui augmentent la perméabilité vasculaire et stimulent le recrutement et l'activation des leucocytes et d'autres cellules immunitaires telles que les monocytes / macrophages, les lymphocytes T et les neutrophiles qui participent au processus angiogénique en sécrétant des cytokines qui affectent la fonction des cellules endothéliales. Ces cytokines peuvent participer à la pathogénèse de la rétinopathie proliférative, en augmentant la perméabilité vasculaire et la promotion de l'apoptose, et peuvent être associées à la néovascularisation (**Przemyslaw *et al.*, 2010**).

III.3.4. Cellules endothéliales et immunoréactivité

III.3.4.1. Antigène CD34

Comme son nom l'indique, le CD34 correspond au cluster de différenciation 34 (**Sidney *et al.*, 2014**).

Le CD34 est une phosphoglycoprotéine transmembranaire, d'abord identifié en 1984 sur des cellules souches et progénitrices hématopoïétiques (**Civin *et al.*, 1984**). Il a un poids moléculaire d'environ 115 kDa et possède un domaine extracellulaire qui est fortement sialylé.

Le ligand le plus souvent décrit pour le CD34 est la L-sélectine (CD62L). (**Baumheler *et al.*, 1993 ; Felschow *et al.*, 2001**).

Le CD34 est largement considéré comme un marqueur de cellules progénitrices endothéliales vasculaires (**Fina L *et al.*, 1990 ; Hristov *et al.*, 2008**). Les propriétés des cellules endothéliales CD34+ sont souvent liées aux cellules hématopoïétiques, car tous deux sont des types cellulaires pouvant être isolés à partir du sang périphérique en utilisant le CD34 comme antigène. (**Mackie *et al.*, 2011**).

Bien que la structure du CD34 soit bien étudiée, sa fonction est encore relativement peu connue. Les études sur les cellules hématopoïétiques suggèrent des rôles dans la cyto-adhérence et la régulation de la différenciation et de la prolifération cellulaire (**Healy *et al.*, 1995 ; Nielsen *et al.*, 2009**).

- **Rôles des cellules CD34+**

Un rôle modulé dans l'adhésion cellulaire est suggéré par le fait que l'expression du CD34 est inversement corrélée à l'expression de deux molécules de surface : Endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) et Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1 ou CD54) dans des cultures de cellules endothéliales (**Van de Rijn *et al.*, 1994**).

La molécule CD34 se caractérise par la présence de plusieurs sites de phosphorylation dans la portion cytoplasmique de la molécule, ce qui suggère que le CD34 pourrait jouer un rôle dans la transduction du signal. D'autres études ont montré que la phosphorylation du CD34 est associée à une expression accrue du CD34 à la surface cellulaire (**Weiss et Nickoloff, 1993**).

III.3.4.2. Facteur de Von Willebrand

Le facteur de von Willebrand (vWF) : est une glycoprotéine produite uniquement par les cellules endothéliales, et est couramment utilisé pour identifier les vaisseaux dans des coupes de tissus. Le vWF est distribué de manière hétérogène dans le système vasculaire.

Le contrôle transcriptionnel en réponse au micro-environnement tissulaire est responsable des variations locales des niveaux du vWF dans les cellules endothéliales. Les facteurs de croissance FGF et VEGF, inducteurs puissants de l'angiogenèse, régule à la hausse l'expression de la protéine vWF dans des cellules endothéliales cultivées (**Zanetta *et al.*, 2000**).

- ✓ **Rôles et Fonctions**

- Le facteur vWF est nécessaire pour la liaison des plaquettes au sous-endothelium pendant l'hémostase.

- Il sert de support pour le facteur de coagulation VIII (**Lollar, 1991**) et est impliquée dans l'adhésion des cellules endothéliales à la lame basale des vaisseaux (**Dejana et al., 1989**).

Bien que le facteur vWF soit largement utilisé comme un marqueur spécifique de la cellule endothéliale, on ne sait que très peu sur les mécanismes qui régulent son expression in vivo (**Lollar, 1991**).

Chapitre II

Matériel et Méthodes

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES**II.1. MATERIEL BIOLOGIQUE****II.1.1. Notre modèle expérimental et son régime alimentaire****II.1.1.1. *Psammomys obesus* : Biotope et écophysiologie**

Pour notre étude, nous avons pris comme modèle le rat des sables diurne « *Psammomys obesus* », (**Figure 13**). Rongeur déserticole de la famille des gerbillidés, qui se nourrit exclusivement de plantes halophile de la famille des Chénopodiacées, à faibles valeurs calorique et à concentration élevée en sel, qui poussent dans son biotope (régions semi-désertiques de M'sila et Biskra) (**Marquie *et al.*, 1980**), il est donc normoglycémique.



Figure 13: *Psammomys obesus* dans son biotope.

II.1.1.2. Métabolisme de notre animal et son importance dans notre étude

Cet animal présente un intérêt particulier car, privé de son alimentation, et soumis en captivité à un stress nutritionnel, il développe un syndrome diabétique de type 2 comparable au diabète clinique. Il constitue ainsi un modèle expérimental de première importance pour une meilleure approche du diabète humain et de ses complications vasculaires.

Nos gerbilles répondent à l'augmentation de l'énergie apportée par leur alimentation provoquant une surcharge calorique par un accroissement de leur poids corporel dû à une augmentation de la taille des adipocytes, 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" (< 100 mU/l). Pendant ce stade, l'insulinorésistance s'installe.

2 - Stade Hyper insulinémique (< 300 mU/l) ou l'insulinorésistance est installée: l'augmentation de la sécrétion insulinaire compense encore la perte d'efficacité de cette molécule.

3 - Stade "Hyper GI" ou l'hyperinsulinémie s'accompagne 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.

4 - Stade Hyperglycémique, les cellules pancréatique se suicident par apoptose et ne peuvent plus produire d'insuline: le taux de cette hormone s'effondre. L'apoptose des cellules semble être causée par l'hyperglycémie. Ce fait a été confirmé par des études in vitro (**Donath et al., 1999**).

II.2. MISE EN ŒUVRE EXPERIMENTALE

II.2.1. Capture et conditionnement des animaux au laboratoire

Les différentes étapes de la chasse sont résumées dans les photos du tableau 3 dans l'annexe II.

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.

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

➤ Répartition 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 13 mois avec une prise journalière de 10g ce qui correspond à 32,5 cal/j ; parallèlement à cet aliment une solution de NaCl à 0,9% est rajoutée.

II.2.2. Régimes alimentaires

Le régime naturel est constitué de plantes halophiles de la famille des chénopodiées de différentes espèces : *-Traganum nudatum, salsola foetidia et suaeda mollis*, caractérisés par une teneur en eau de 80,8% et en sels de 6,9%. La valeur énergétique des plantes fraîches est estimée à 450 calories/kg, avec une prise journalière de 50g/j ce qui correspond à 20-22 cal/j.

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).

Le régime hypercalorique est sous forme de biscuits. L'animal consomme approximativement 32,5 cal/jour pour une prise de 10 g/jour de ce régime, qui est hypercalorique pour *Psammomys obesus*. Le passage du régime alimentaire à base de plantes halophiles au régime hypercalorique se fait également de façon progressive.

Les tableaux 4 et 5 de l'annexe II donnent la composition en nutriments du régime naturel hypocalorique et hypercalorique du laboratoire.

II.3. EXPERIMENTATIONS IN VITRO

II.3.1. Techniques opératoires

II.3.1.1. Contrôle du poids corporel

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

II.3.1.2. Prélèvement des échantillons

☞ Prélèvement 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 dans 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 13 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.



Figure 14 : Prélèvement sanguin rétro-orbital chez *Psammomys obesus*. (Photo original, 2015)



Figure 15 : Prélèvement des globes oculaires chez *Psammomys obesus*. (Photo original, 2015)

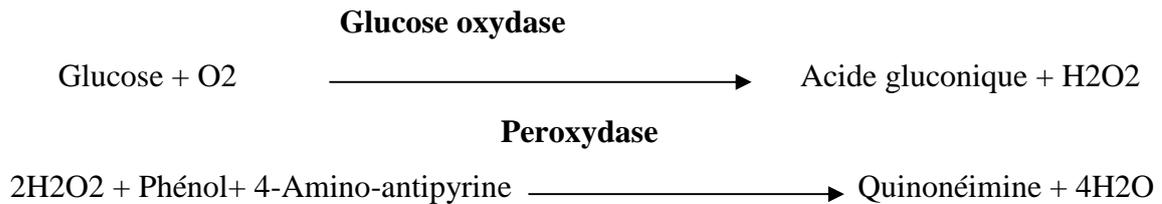
II.3.2. Techniques analytiques

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

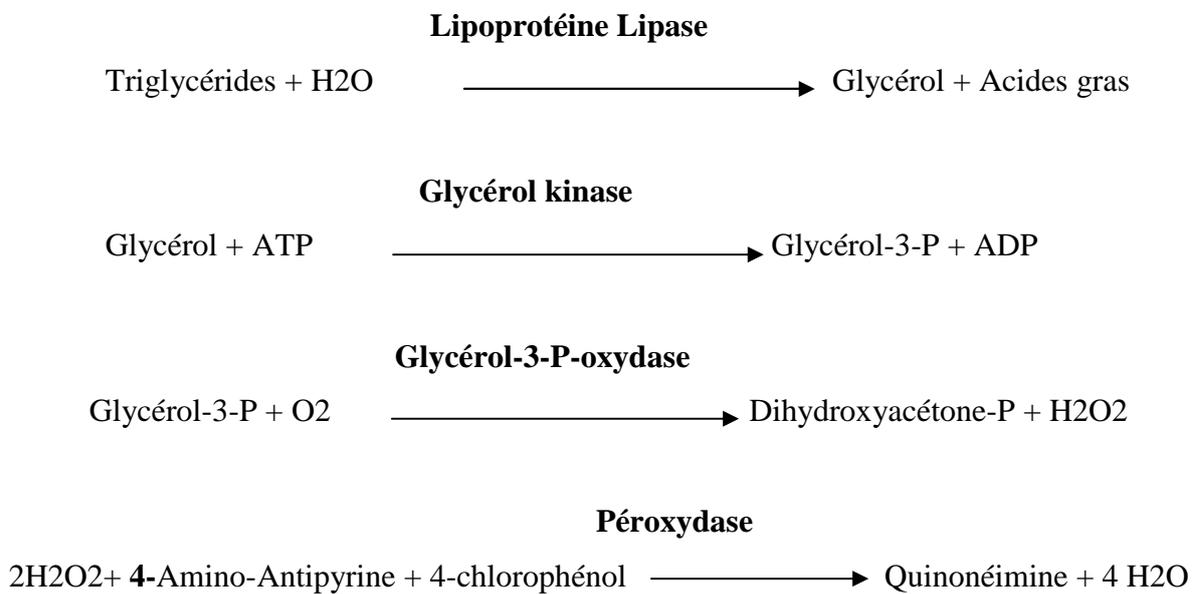
Afin de confirmer que nos animaux sont devenus diabétiques nous avons effectués les dosages plasmatiques du glucose, des triglycérides, du cholestérol ainsi que de l'insuline.

II.3.2.1.1. Principes des dosages**➤ Dosage du glucose**

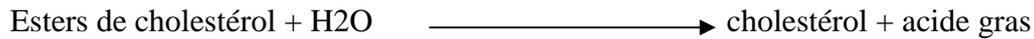
Le dosage du glucose sanguin est réalisé par une méthode colorimétrique enzymatique à la glucose oxydase selon les réactions suivantes :

**➤ Dosage des triglycérides**

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

**➤ Dosage du cholestérol**

Le principe du dosage du cholestérol total (estérifié+ libre) est déterminé par une méthode colorimétrique enzymatique selon les réactions suivants :

Cholestérol estérase**Cholesterol oxydase****Peroxydase**

La quantité de quinoneimine (l'intensité de la coloration) formée est proportionnelle à la concentration du cholestérol total dans le sérum.

➤ 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 :

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif	2 ml	2 ml	2 ml
Etalon	-	20 µl	-
Echantillon	-	-	20 µl

Tableau 1 : 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.
- La lecture est effectuée au spectrophotomètre, à une longueur d'onde = 500 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

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

= absorbance

n= concentration de l'étalon

n= 2g/l

II.3.3. 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 :

$$\bar{X} = \frac{\sum x_i}{n}$$

- x_i : désigne la fréquence
- N : effectif

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

$$S^2 = \frac{\sum (x - \bar{X})^2}{n - 1}$$

La variance totale :

$$S^2 = \frac{(N_1 \cdot S_1^2) + (N_2 \cdot S_2^2)}{(N_1 + N_2) - 2}$$

- S^2 : (Ecart-type) ²

- N_1 : effectif du lot a

- N_2 : effectif du lot b

Ecart type S:

$$S = \sqrt{S^2}$$

Erreur standard à la moyenne :

$$ES(M) = \frac{s}{\sqrt{n-1}}$$

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

La valeur t de Student est donnée par la formule suivante:

$$t = \frac{m_A - m_B}{\sqrt{\frac{S^2}{n_A} + \frac{S^2}{n_B}}}$$

Pour savoir si la différence est significative, il faut tout d'abord lire dans la table t, la valeur critique correspondant au risque alpha = 5% pour un degré de liberté :

$$\text{d.d.l.} = n_a + n_b - 2$$

Si la valeur absolue de t (|t|) est supérieure à la valeur critique, alors la différence est significative. Dans le cas contraire, elle, ne l'est pas.

Le **degré de significativité** ou **p-value** correspond au risque indiqué par la **table de Student** pour la valeur |t|

Pour un ddl de (Na+Nb)-2 et à 5% d'erreur, la valeur du T de Student 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 $P < 0,001$ (***)
- Hautement significative si $P < 0,0001$ (****)

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

II.3.4. Technique histologique

II.3.4.1. Préparation des coupes histologiques

☞ Fixation

Les globes oculaires prélevés sont rapidement fixés au formol à 10%. 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 μ m. Elle consiste à faire séjourner les pièces dans une série de liquides intermédiaires ;

- **Déshydratation** qui consiste à éliminer l'eau qui existe dans le tissu par passage des cassettes d'échantillons dans des bains d'alcool éthylique à des degrés croissants pendant 2h pour chaque bain.
- **Clarification ou éclaircissement** qui consiste à éliminer l'alcool utilisé dans la déshydratation par un solvant organique, le xylène (2 bains/ 2h chacun) préparant ainsi le tissu à l'imprégnation. Le xylène rend le tissu translucide et facilite la pénétration de la paraffine à l'intérieur du fragment déshydraté.
- **Imprégnation** consiste à remplacer l'eau des tissus et ceci pour pouvoir confectionner des coupes très minces; c'est la dernière étape qui aboutit à la substitution du xylène par la paraffine liquide qui remplace l'eau éliminée des tissus (2 bains/ 2h chacun).

☞ 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.

Confection des coupes

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

Etalement des coupes

Les rubans sont ramollis dans un bain marie à 37°C, puis recueillis sur des lames en verre préalablement numérotées à l'aide d'un crayon. 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.3.4.2. Coloration à l'Hématoxyline-Eosine (HE)

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.
- Rinçage à l'eau courante.
- Coloration à l'hématoxyline.
- Rinçage à l'eau courante.
- Passage des coupes dans une solution de carbonates de lithium (Li₂CO₃).
- Rinçage à l'eau courante.

- Coloration à l'éosine puis rinçage.
- 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.

II.3.4.3. Immuno-Histochimie (VEGF, VE-cadhérine, CD34, CD31 et vWF)

Principe

L'immunohistochimie (IHC) est une méthode immuno-enzymatique qui repose sur le principe antigène-anticorps primaire-anticorps secondaire (Ag-Ac I-AC II) ; elle permet de localiser les antigènes (Ag) membranaires, cytoplasmiques, nucléaires, ou des protéines de la matrice extracellulaire, grâce à des anticorps (Ac) spécifiquement dirigés contre eux, ces derniers permettent l'amplification du marquage par un système de révélation dont l'avantage est de fixer les molécules de chromogènes permettant de mieux visualiser le complexe Ag-Ac visible au microscope optique.

Préparation des anticorps

Pour notre étude nous avons choisis 5 marqueurs angiogéniques principaux : le VEGF, la VE-cadhérine, le CD34, le CD31 et le vWF.

Nous avons inscrit le nom des marqueurs sur les Eppendorf dans lesquels nous avons effectués les dilutions dans un diluant spécifique à anticorps du kit de révélation en suivant le taux de dilution mentionné. 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, incubation 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 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)
- On applique 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 ammoniacuée

☞ Montage aqueux

Sur lame et lamelle faramount, pour l'observation.

☞ Examen microscopique

Les coupes sont observées et prises en photos. 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 :

$$G_f = G_o \times I_m \times F_a$$

G_f = grossissement final ; G_o = grossissement de l'objectif ; I_m = indice du microscope ; F_a = facteur d'agrandissement de la photo par rapport à la taille du cadrant de la visualisation de l'appareil numérique.

Chapitre III

Résultats & Discussion

CHAPITRE III: RESULTATS & DISCUSSION**III.1. RESULTATS****III.1.1. Résultats métaboliques**

Nous présentons les résultats analytiques sous formes de tableaux récapitulatifs (Annexes III) et graphiques, pour un meilleur aperçu. Toutes les valeurs moyennes de chaque paramètre sont affectées de l'erreur standard à la moyenne (Test de Student).

- Nous analyserons successivement les paramètres biochimiques plasmatiques chez les rats des sables témoins soumis au RN pendant une durée de 13 mois.
- Nous comparerons ces mêmes paramètres biochimiques enregistrés au cours du DT2 chez le rat de sables soumis à un RHC pendant la même période (13 mois).

III.1.1.1. Evolution du poids corporel des *psammomys* témoins et des *psammomys* soumis au RHC pendant 13 mois

Les résultats ainsi obtenus nous permettent de constater que l'évolution pondérale des rats soumis au RN pendant 13 mois varie faiblement de 68.80 ± 1.33 g à 97.90 ± 0.99 g en fin d'expérimentation.

Par contre les *Po* soumis au RHC pendant la même période développent après 3 mois de régime une augmentation pondérale assez conséquente et progressive, allant de 77.40 ± 0.78 g à 208.40 ± 0.98 g au bout de 13 mois. (Figure 16 ci-dessous et tableau 6 en annexe III).

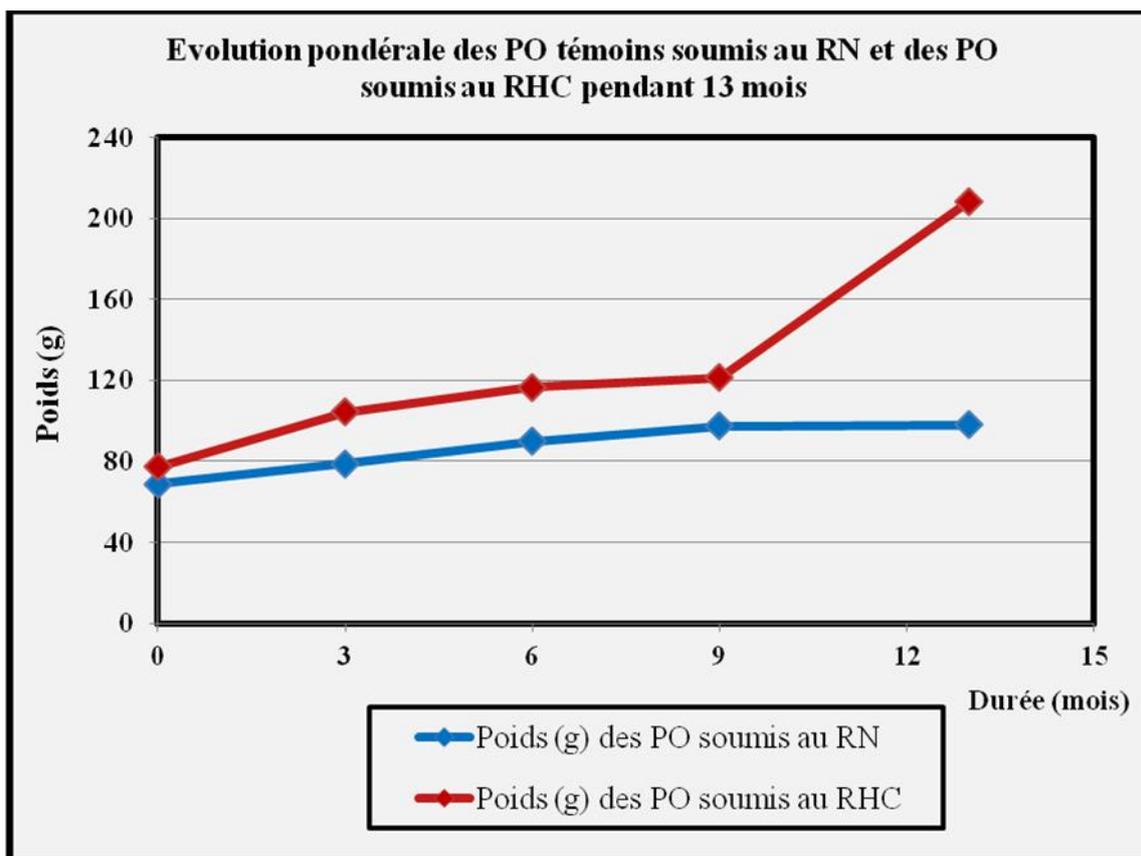


Figure 16 : Représentation graphique de l'évolution pondérale en g des *Psammomys obesus* témoins soumis au RN et des *Psammomys obesus* soumis au RHC pendant 13 mois.

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 est relativement stable durant toute la durée du régime, atteignant une valeur de 74.10 ± 1.08 mg/100ml après 13 mois.

Les rats soumis au RHC subissent une augmentation glycémique importante dès le troisième mois du RHC, atteignant après 13 mois une moyenne de 210.20 mg/100ml. (Figure 17 ci-dessous et tableau 7 en annexe III)

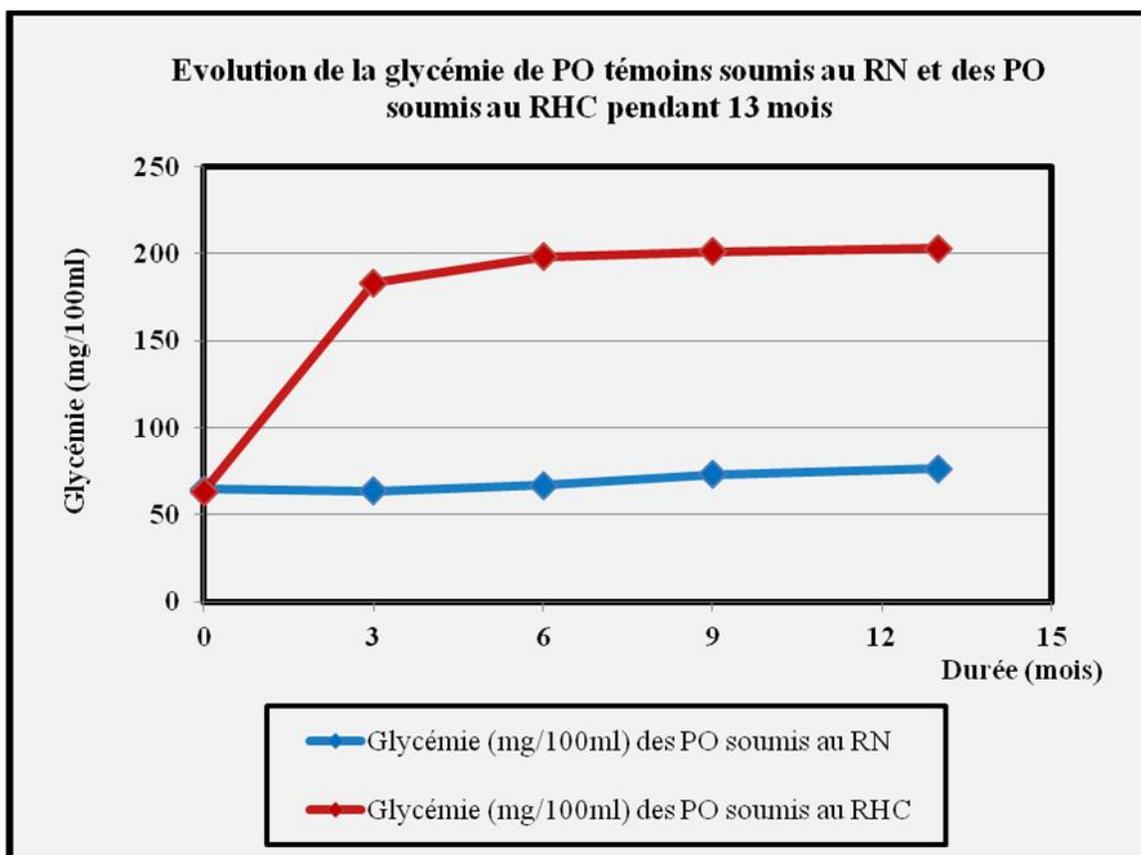


Figure 17 : Représentation graphique de l'évolution de la glycémie en mg/100ml des *Psammomys obesus* témoins soumis au RN et des *Psammomys obesus* soumis au RHC pendant 13 mois

III.1.1.2.2. Triglycéridémie

Pour les PO témoins soumis au RN pendant 13 mois, les valeurs des triglycérides passent d'une moyenne de 67.70 mg/100ml pour arriver à une moyenne de 74.60 mg/100ml en fin d'expérimentation, par conséquent leur triglycéridémie est stable.

Chez les PO soumis au RHC, nous constatons une augmentation importante de la triglycéridémie allant de 76.67 ± 0.95 mg/100ml en début d'expérimentation et atteignant une valeur de 249.98 ± 7.21 mg/100ml après 13 mois. (Figure 18 et tableau 8 dans annexe III).

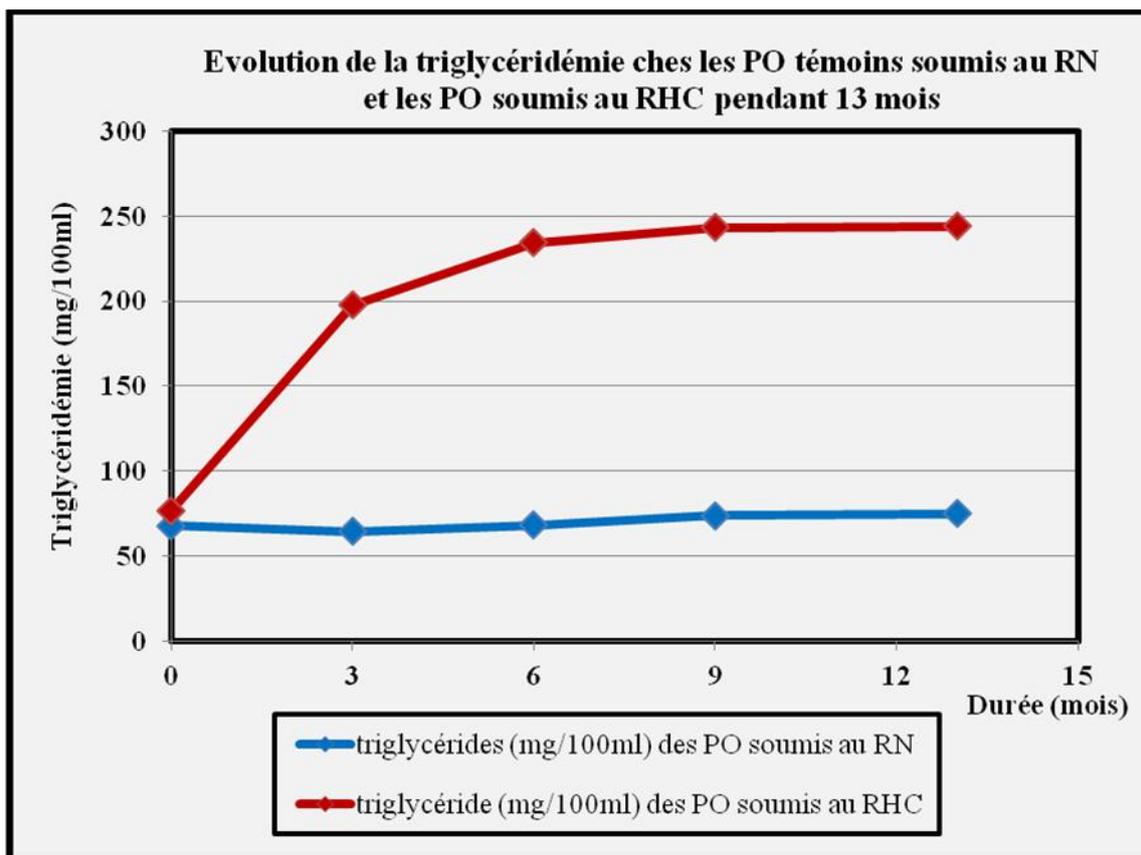


Figure 18 : Représentation graphique de l'évolution de la triglycéridémie des *psammomys obesus* témoins soumis au RN et des *psammomys obesus* soumis au RHC pendant 13 mois.

III.1.1.2.3. Cholestérolémie

Pour les rats témoins soumis au RN, la cholestérolémie fluctue légèrement, sa valeur augmente de 54.90 ± 0.78 mg/100ml à 58.65 ± 1.12 mg/100ml de plasma en fin de régime.

Pour les rats soumis au RHC, le taux cholestérol total augmente de 52.60 mg/100ml à 142.60 mg/100ml au bout de 13 mois de régime hypercalorique. (Figure 19 et tableau 9 dans annexe III).

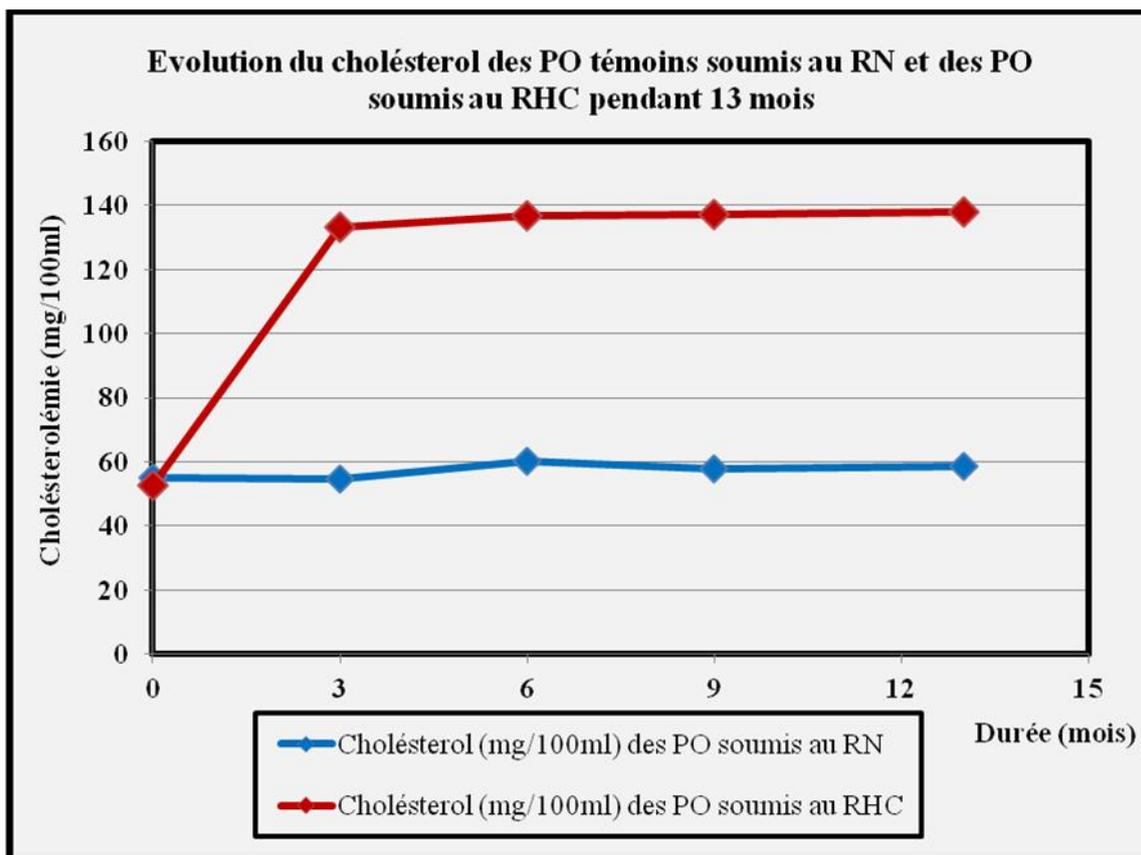


Figure 19: Représentation graphique de l'évolution de la cholestérolémie en mg/100ml des *Psammomys obesus* témoins soumis au RN et des *Psammomys obesus* soumis au RHC pendant 13 mois.

III.1.1.2.4. Insulinémie

L'insuline immunoréactive plasmatique contrôlée chez les rats sous RN est de l'ordre de 26.20 ± 0.48 μ UI/ml de plasma. En fin d'expérimentation, l'insulinémie ne varie que très peu atteignant une valeur de 27.90 ± 0.46 μ UI/ml de plasma.

Pour les rats sous RHC, les taux de l'insuline plasmatique augmentent continuellement et atteignent des valeurs allant jusqu'à 368.25 ± 7.48 μ UI/ml de plasma après 13 mois de régime. (Figure 20 et tableau 10 dans annexe III).

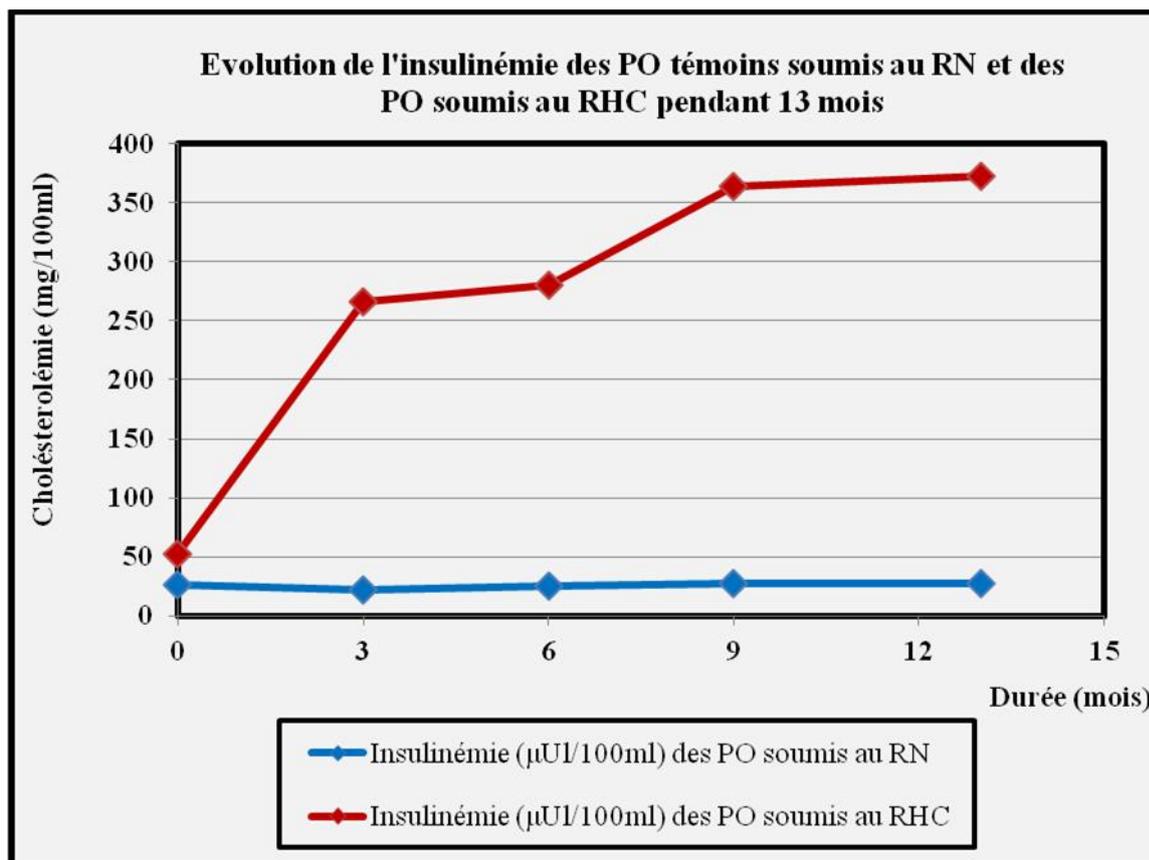


Figure 20: Représentation graphique de l'évolution de l'insulinémie en $\mu\text{UI}/\text{ml}$ des *psammomys obesus* témoins soumis au RN et des *psammomys obesus* soumis au RHC pendant 13 mois.

III.1.1.3. Discussion des résultats métaboliques

L'alimentation naturelle de *Psammomys obesus* et son adaptation à son biotope ont une grande influence sur sa physiologie. Le *Psammomys obesus* est une gerbille adaptée à un environnement désertique, dont l'organisme réagit à la disponibilité variable de nourriture par des contrôles endocrine spécifiques.

Nos résultats métaboliques ont démontrés que durant leur captivité au laboratoire, les *Psammomys obesus* nourris au régime de leur biotope naturel n'ont révélé aucune altération fonctionnelle sur le plan métabolique sanguin. La glycémie, l'insulinémie et les lipides (triglycérides et cholestérol total) restent stables non modifiés. Ils se maintiennent normoglycémique normoinsulinémiques et normolipidiques durant toute l'expérimentation et ne contractent pas de diabète.

Soumis à un régime hypercalorique, les animaux deviennent obèses et développent les symptômes d'un diabète de type 2 (DIND) à partir du 3ème mois de régime.

Le Psammomys obesus a comme caractéristique première une prédisposition au DT2, mais en captivité, il affiche tous les signes du syndrome métabolique et développe séquentiellement l'obésité, l'insulinorésistance et le DT2 (Zoltowska *et al.*, 2001). Dans ces conditions, les concentrations plasmatiques de triglycérides et de cholestérol total sont très élevées. L'ensemble de nos données valident le *Psammomys obesus* comme un modèle animal remarquable pour étudier le syndrome métabolique.

III.1.2. Résultats et Discussion de l'étude histologique et immunohistochimique

L'étude histologique nous a permis de suivre l'évolution des complications vasculaires rétinienne, consécutive à l'hyperglycémie chronique, chez notre modèle animal qui présente un DT2, et d'observer les différentes modifications structurales corrélées aux phases cliniques de la rétinopathie diabétique.

L'étude immunohistochimique (IHC) nous a permis en premier lieu de mettre en évidence l'expression différentielle du facteur de croissance endothéliale-vasculaire (VEGF), facteur angiogénique clé, au cours des stades précoces et avancés de la RD.

D'autre part, l'immunomarquage nous a permis de démontrer l'expression déficiente de la VE-cadhérine, protéine de jonction essentielle à l'adhérence inter-endothéliale, au cours des stades précoces de la RD.

Finalement, l'IHC nous a permis de déterminer la présence des vaisseaux sanguins normaux, des vaisseaux ischémiques, et des néo-vaisseaux par trois marqueurs endothéliaux : CD34, CD31 et vWF.

Les figures suivantes représentent des photographies des coupes histologiques de la rétine de *Psammomys obesus* colorées à l'hématéine éosine et des photographies de l'immunomarquage au VEGF, VE-cadhérine, CD34, CD31, et vWF, observées au grossissement total : $\times 50$, $\times 200$, $\times 400$, et $\times 1000$

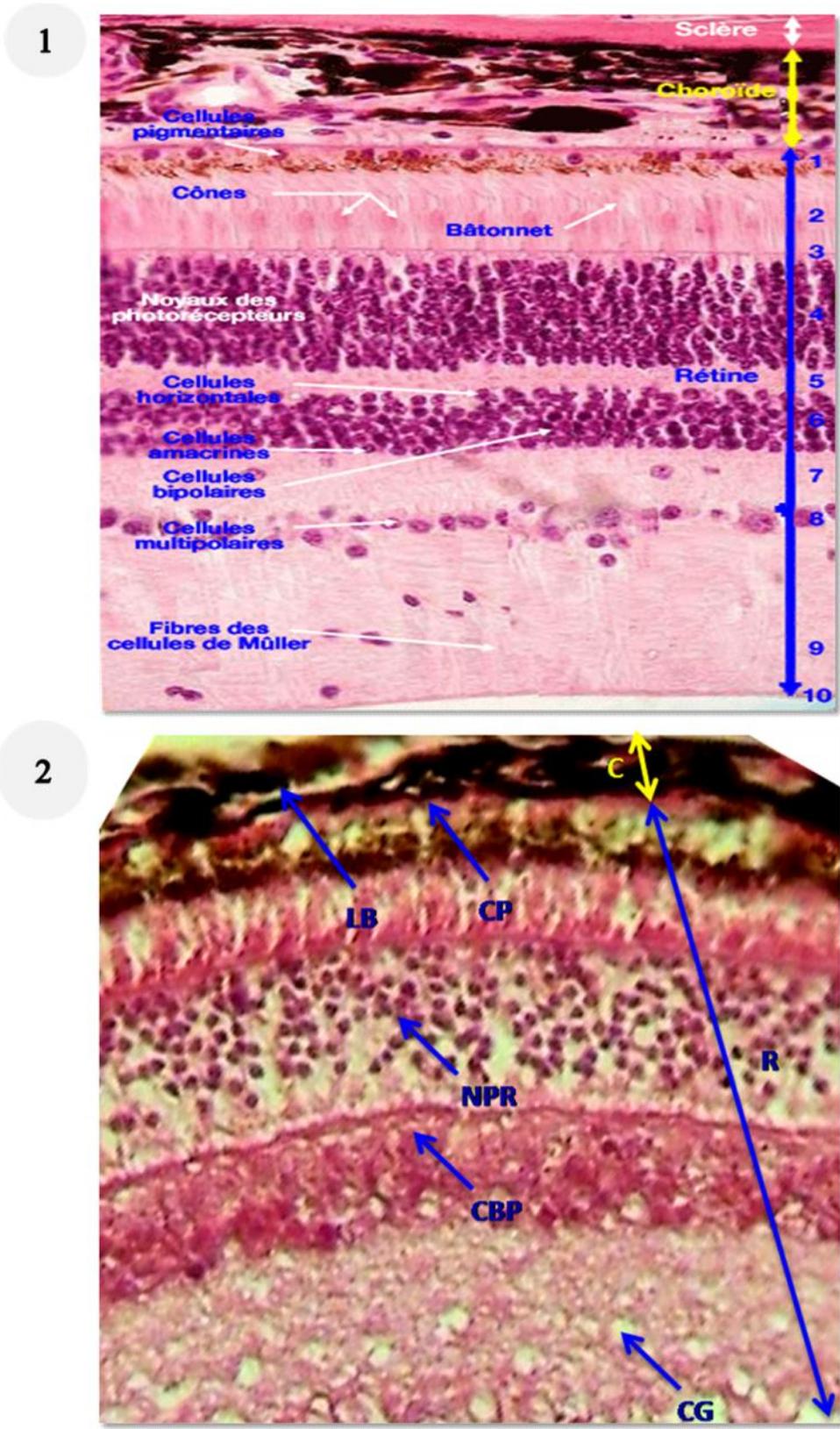


Planche I : Coupe histologique de la rétine humaine et celle de *Psammomys obesus*.

Figure 1 : Coupe histologique de la rétine humaine, colorée à l'hématéine éosine ; G × 400. (D'après Kahle, 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.
 - **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), couche la plus interne, en contact avec le corps vitré (V).

➤ Discussion des résultats histologiques de la planche I

En se basant sur nos résultats histologiques précédents, nous avons pu répondre partiellement sur notre première question : « Peut-on considérer le *Psammomys obesus* comme modèle pour l'étude de la rétinopathie diabétique sur le plan anatomo-histologique ? »

Dans une première approche, nous avons constaté après une analyse comparative entre la rétine humaine et celle de *Psammomys obesus* (planche I), une représentation de la même architecture tissulaire rétinienne avec une organisation similaire des différentes couches qui la constituent.

En s'appuyant sur nos coupes histologiques, nous remarquons clairement qu'il existe une très grande ressemblance entre la composition de la rétine humaine et celles du *Psammomys obesus*, ceci vient appuyer les résultats déjà prouvés par des études ultérieures concernant la pertinence de ce modèle pour l'étude de l'histologie rétinienne (Saïdi et al., 2011).

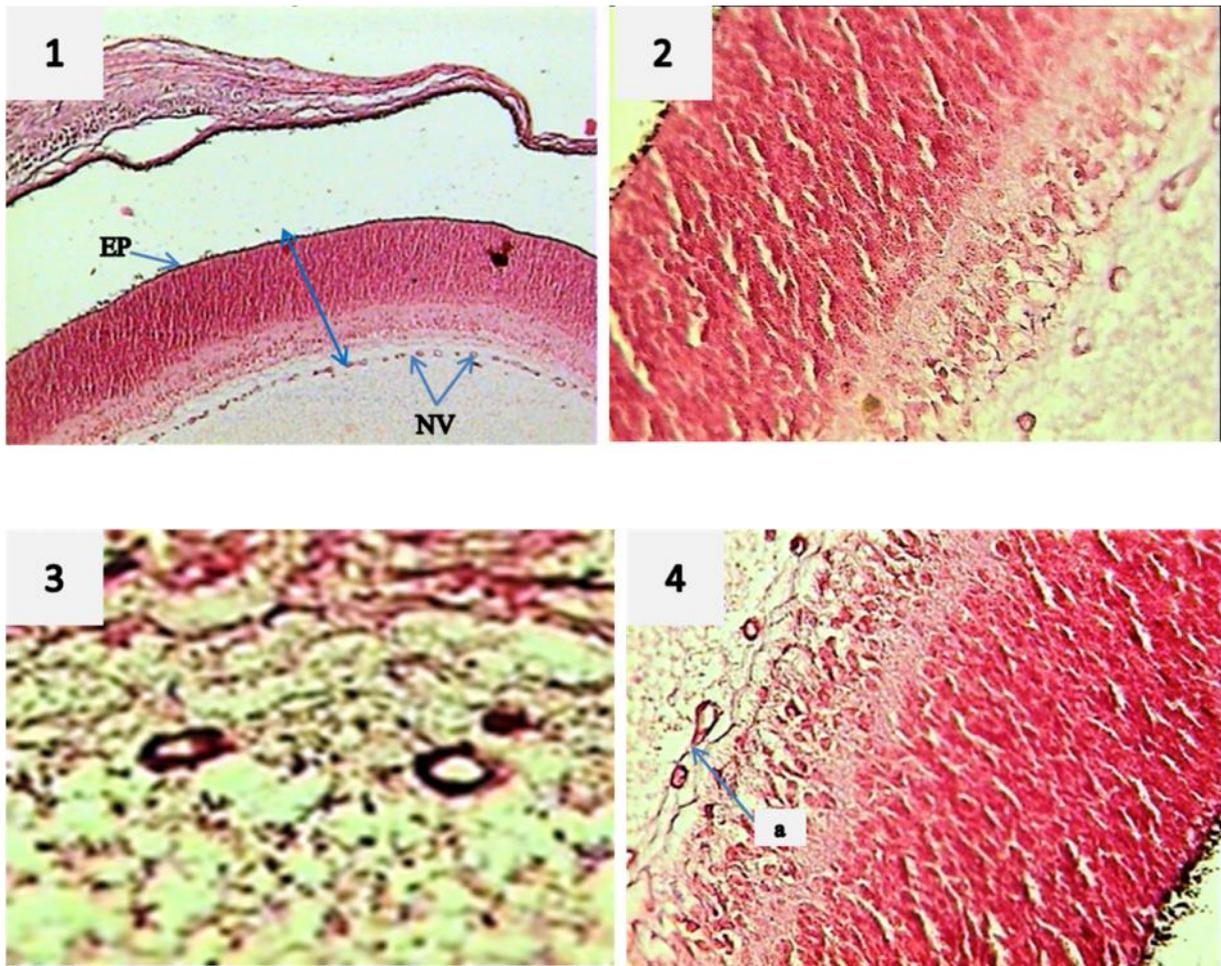


Planche II : Coupes histologiques de la rétine de *Psammomys obesus* foetal colorées à l'hématoxyline éosine.

Figure 1, 2, 3, 4 : Coupe histologique de la rétine de Po foetal colorée à l'hématoxyline éosine ; G \times 50, G \times 200, G \times 400, G \times 200 respectivement.

- Les coupes histologiques de la rétine foetale représentée sur les figures 1 et 2, mettent en évidence le développement des différentes couches de la rétine de Po au stade foetal.

A ce stade là, nous constatons que le développement des différentes couches de la rétine n'est pas encore bien établis (Flèche bleu), et la différenciation des cellules n'est pas très bien distinctes.

- 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.

- Les coupes histologiques de la rétine foetale représentées ci-dessus, mettent en évidence le développement des micro-vaisseaux néoformés par un processus de vasculogénèse (NV). Il n'existe pas de vaisseaux s'étendant au-delà de la membrane limitante interne (ILM ou

Internal limiting Membrane). Ces vaisseaux ont une structure relativement normale (Figure 3), mais n'ont pas encore atteints leur maturité.

- Nous pouvons également observer un début de la vascularisation rétinienne (visibles dans les figures 2 et 4) où les vaisseaux sanguins (NV) sont en cours de division, c'est le processus d'angiogenèse (a).

➤ Discussion des résultats histologiques de la Planche II

Nos résultats histologiques sur des coupes de la rétine d'un Po fœtal nous permettent de mettre en évidence l'intérêt des deux barrières hémato-rétiniennes (BHR) au cours de l'installation des différentes couches de la rétine.

Selon les figures des coupes histologiques du Po fœtal, nous constatons que les différentes couches rétinienne ne sont pas encore bien établies à ce stade, et qu'il n'existe pas de limites entre chaque couche. Au niveau de ces coupes, nous remarquons également que les cellules de toutes les couches ne sont que peu différenciées, et sont à peine identifiable.

La structure histologique de la rétine du Po fœtal indique clairement l'installation précoce de la barrière hémato-rétienne interne qui forme une succession de vaisseaux nouvellement formés. Cette barrière est mise en place avant la stratification du reste des couches de la rétine, démontrant ainsi son importance dans l'homéostasie tissulaire.

Les cellules endothéliales, en plus des péricytes et cellules de Müller, participent à la formation et à la fonction des barrières hémato-rétiniennes (BHR), on en distingue deux :

- BHR interne : constitué des capillaires qu'on retrouve dans la couche plexi-forme interne.
- BHR externe : constitué des vaisseaux de la choroïde et des jonctions intercellulaires de l'épithélium pigmentaire.

Ces deux barrières sont 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 (Friedlander, 2007; Mendes-Jorge, 2009).

La barrière hémato-rétinienne (BHR) joue un rôle important dans la régulation homéostatique du microenvironnement de la rétine. Elle contrôle les mouvements liquidiens et moléculaires entre les lits vasculaires de l'œil et le tissu rétinien. Cette barrière empêche l'entrée de macromolécules et autres agents potentiellement nuisibles, dans la rétine. La BHR interne est formée par les jonctions étanches (serrées) entre les cellules endothéliales lesquelles sont entourées par les prolongements des cellules gliales de Müller et des astrocytes alors que la BHR externe est formée par les jonctions étanches entre les cellules de l'épithélium pigmentaire (**Ashton 1965; Reichenbach et al. 2007; Shakib et Cunha-Vaz 1966**).

Les barrières hémato-oculaires s'opposent à la pénétration des médicaments à l'intérieur du globe et par ailleurs leur dysfonctionnement est à l'origine de nombreuses maladies cécitantes.

Au cours du diabète, les propriétés de la barrière hémato-rétinienne, constituée des trois types cellulaires (cellules endothéliales, péricytes et cellules de Müller), est affectée

les modifications histologiques de la RD sont principalement dues :

- à une augmentation du flux de perfusion
- à l'hyperperméabilité des BHR

L'altération des BHR, caractérise les stades précoces de la pathologie.

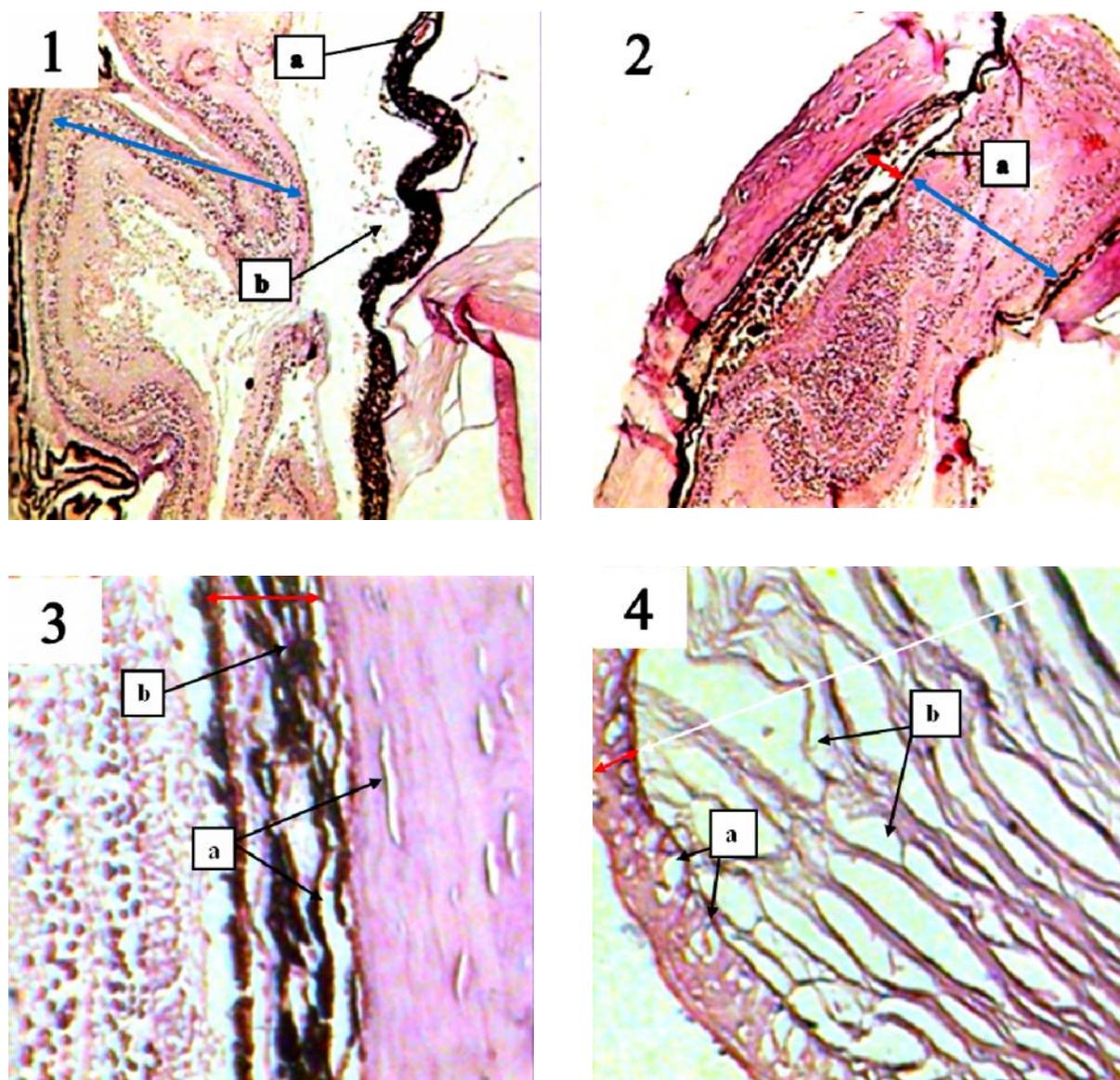


Planche III : Coupes histologiques de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique colorée à l'hématoxyline éosine.

Figure 1 : Coupe histologique de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique montrant une désorganisation de la neurorétine. Coloration à l'hématéine éosine ; G \times 100.

- Nous observons une altération de la morphologie de la neurorétine (flèche bleue) avec absence d'organisation des couches rétiniennes consécutive à l'apoptose des cellules neuronales et l'altération des cellules gliales. Notons la présence d'obstruction d'un vaisseau sanguin (a) au niveau de la choroïde (b).

Figure 2 : Coupe histologique de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique. Vue d'ensemble. Coloration à l'hématéine éosine ; G \times 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.

Figure 3 : Coupe histologique de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique montrant une dystrophie choroïdienne. Coloration à l'hématéine éosine ; 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 (a) avec de multiples hémorragies (b) situées entre ces dernières.

Figure 4 : 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 indique une altération de la conjonctive (flèche rouge) avec présence de cellules rondes possédant un cytoplasme vacuolisé (a) ainsi qu'une forte dissociation des faisceaux des fibres collagènes (b) au niveau de la sclérotique (flèche blanche).

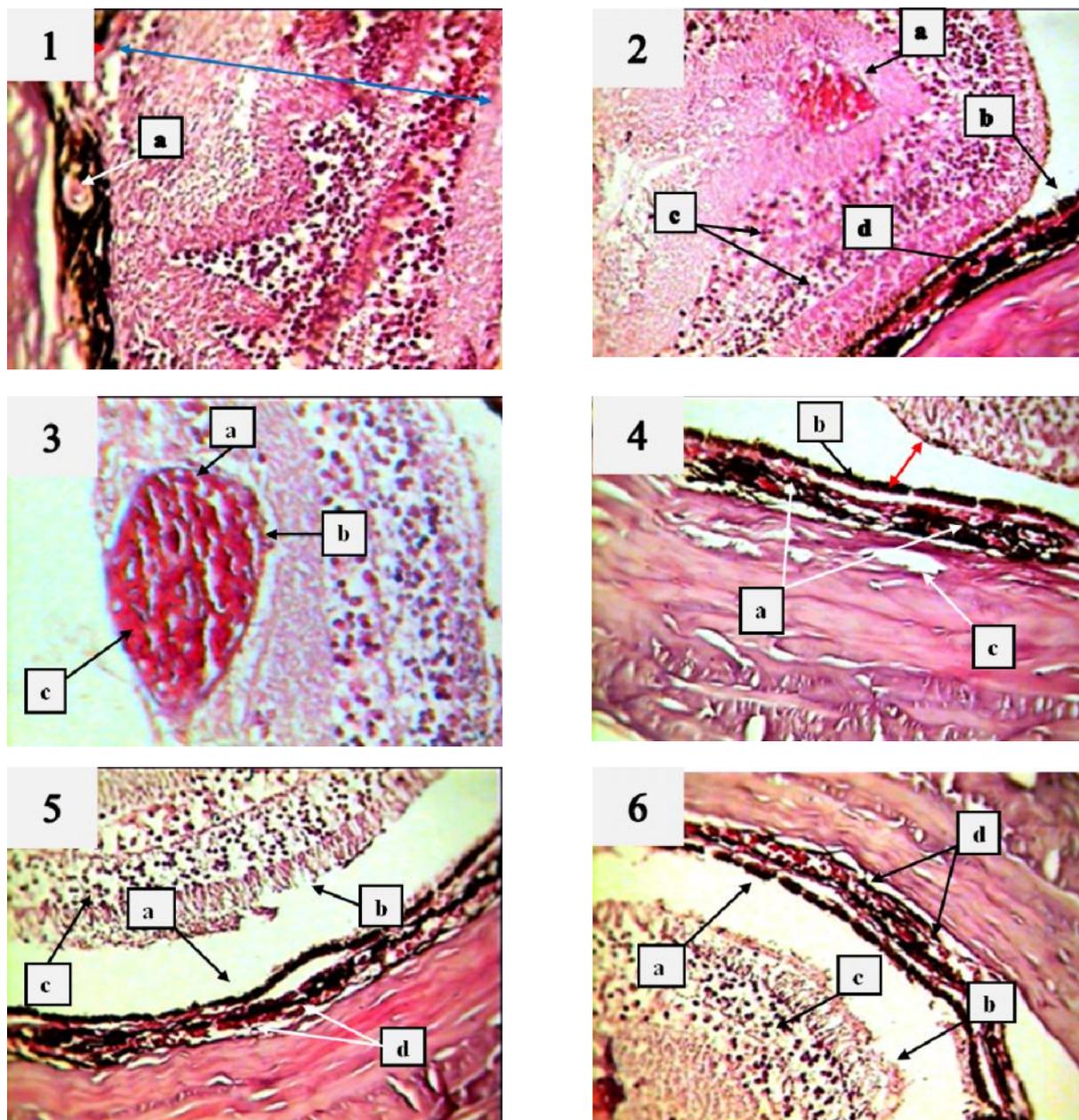


Planche IV : Coupes histologiques de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique colorées à l'hématoxyline éosine.

Figure 1: Coupe histologique de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique montrant une obstruction des vaisseaux choroïdiens. Coloration à l'hématéine éosine ; $G \times 1000$.

- Le grossissement utilisé permet de bien mettre en évidence une occlusion d'un vaisseau sanguin (a) au niveau de la choroïde (flèche rouge) ainsi qu'une désorganisation complète de la neurorétine (flèche bleue).

Figure 2 : Coupe histologique de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique montrant un microanévrisme intrarétinien. Coloration à l'hématéine éosine ; $G \times 600$.

- Cette coupe met en évidence un microanévrisme d'un capillaire rétinien (a) 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 (b) dont les jonctions serrées s'ouvrent aboutissant à la rupture de la BHR externe. Les noyaux des couches des grains (c) sont de densité diminuée. Notant aussi la présence d'hémorragies choroïdiennes (d).

Figure 3 : 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 (a) qui s'est développé à partir d'une dilatation de la paroi capillaire (b) constituant la BHR interne. Cette paroi est épaissie à cause de la prolifération accrue des cellules endothéliales (c) après dégénérescence des péricytes. Notant aussi l'absence de lumière qui est complètement obstruée.

Figure 4: Coupe histologique de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique montrant des hémorragies choroïdiennes. Coloration à l'hématéine éosine ; G × 1000.

- Nous observons des hémorragies (a) 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 (b) qui apparaît déchiqueté suite à la rupture de ses jonctions intercellulaires. Une importante altération de la sclérotique est également observée avec dissociation des faisceaux des fibres collagènes (c).

Figure 5 : Coupe histologique de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique montrant un décollement rétinien. Coloration à l'hématéine éosine ; G × 1000.

Figure 6: Coupe histologique de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique montrant un décollement rétinien. Coloration à l'hématéine éosine ; G × 1000.

Ces deux coupes montrent un stade très avancé de la rétinopathie diabétique. La neurorétine est complètement séparée de l'épithélium pigmentaire (a) avec dégénérescence et disparition des segments externes des photorécepteurs (b). Les noyaux des couches granulaires (c) de densité diminuée témoignant l'apoptose des cellules neuronales rétiniennes. Des hémorragies choroïdiennes (d) sont observées avec altération et déstructuration complète de la choroïde.

➤ **Discussion des résultats histologiques de la Planche III et IV**

Nos résultats histologiques sur des coupes de rétines de Po diabétiques à des stades plus ou moins avancés (6 / 9 / 13 mois de RHC), mettent en évidence le degré des lésions structurales du tissu rétinien, suite à un régime alimentaire hypercalorique lié à une hyperglycémie sévère et chronique.

Selon les figures (1) et (2) de la Planche III, nous constatons un remaniement total de l'architecture du tissu rétinien. Les couches rétiniennes sont sévèrement altérées et difficile à distinguer, témoignant d'un processus apoptotique responsable de la perte de plusieurs types cellulaires tels les cellules gliales et les péricytes.

Ces résultats viennent étayer l'observation d'un ensemble d'altérations structurales et fonctionnelles regroupés sous le nom de « microangiopathies », semblable à ceux observés chez l'Homme. La structure de la rétine du Po étant semblable à celle de l'Homme, elle permet ainsi une comparaison relativement fiable.

Les figures (1), (2), (3), (4), (5), et (6) de la Planche IV, sont des coupes histologiques de la rétine de Po diabétiques relatant les différentes altérations structurales observées au cours des phases de la rétinopathie diabétiques.

Nos observations indiquent clairement l'installation d'un processus physiopathologique de la RD semblable à celui de l'Homme, lié à la chronicité de l'hyperglycémie induite par un RHC chez notre animal model *Psammomys obesus*. Ceci vient appuyer des études ultérieures (Saïdi *et al.*, 2011 ; 2012).

L'obstruction des vaisseaux sanguins observés au niveau des coupes histologiques : figure 1 (a) de la Planche III et de la figure 1 (a) de la planche IV, et l'observation consécutive des microavérysms intrarétinien (figure 2 (a) de la Planche VI) et de microanévrisme capillaire (figure 3 (a) de la Planche VI), marque les stades avancés de la RD.

La présence d'hémorragies choroïdiennes (figure 4 (a) de la Planche VI) et des décollements rétiniens, indique l'arrivée au stade avancée de la RD, à savoir : Stade prolifératif.

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 rétiniennes 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. (Yang *et al.*, 2010) : Hyperperméabilité - fragilité capillaire - ischémie rétinienne.

Notre model animal ; *Psammomys obesus*, reproduit les altérations micro-vasculaires, secondaire à une hyperglycémie, suite à un RHC ; validant ainsi sa pertinence dans l'étude de l'évolution de la RD.

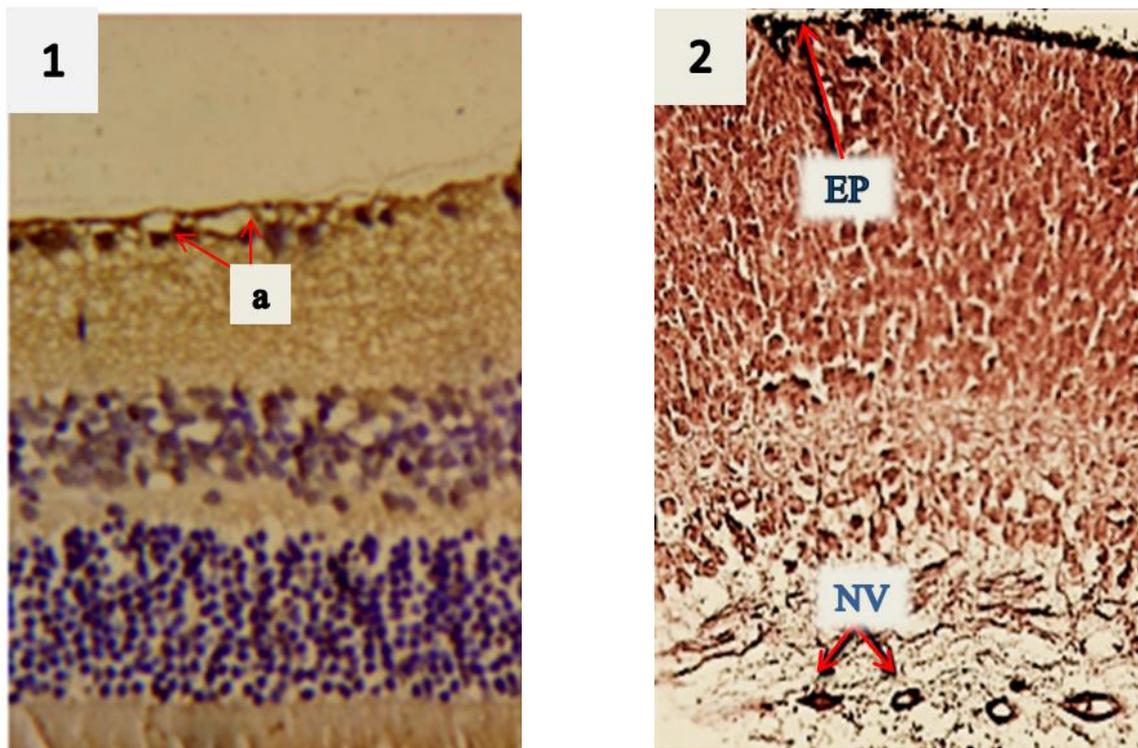


Planche V : Coupes histologiques de la rétine de *Psammomys obesus* : foetal et diabétique marquées au VEGF ; G \times 400.

Figure 1 : Coupe histologique de la rétine de Po diabétique (entre 3 / 6 mois de RHC), marquée au VEGF ; G \times 400.

- Au niveau de cette coupe histologique nous constatons que l'architecture des couches rétiniennes est encore bien structurée et aucune désorganisation des structures n'est observée.
- Le marquage effectué au VEGF est fortement exprimé au niveau des capillaires rétiniens (a), de la BHR interne du Po diabétique.

Figure 2 : Coupe histologique de la rétine du Po foetal marquée au VEGF ; G \times 400.

- Nous observons la présence de vaisseaux sanguins au niveau de la rétine du Po foetal, et ceux avant même l'établissement des structures de la rétine de l'animal. Ces vaisseaux expriment fortement le VEGF, témoignant d'un processus angiogénique.

➤ **Discussion des résultats de l'immunomarquage au VEGF de la Planche V**

Nos résultats de l'immunomarquage au VEGF démontrent clairement une surexpression de ce facteur au niveau de la rétine des Po diabétiques, témoignant de la présence d'un processus angiogénique au niveau de ce tissu. En parallèle, le marquage des rétines fœtales, indique clairement la présence de ce facteur à des taux assez considérables, dans un cadre physiologique.

La famille des VEGF est composée de sept membres de protéines qui jouent un rôle important dans la physiologie du système vasculaire, incluant la vasculogénèse, l'hématopoïèse, l'angiogénèse et la lymphangiogénèse. (Roskoski, 2007).

Le VEGF joue un rôle important dans le développement vasculaire fœtal, et ces niveaux sont décroissants après la naissance. Il est exprimé par les cellules gliales rétinienne (Murata *et al.*, 1996) et les cellules endothéliales vasculaire (Levy *et al.*, 1995).

Le VEGF est sécrété par de nombreux types de cellules oculaires (Miller *et al.*, 1997), et des taux élevés du VEGF ont été détectés dans les fluides oculaires de patients atteints de rétinopathie diabétique proliférante (Aiello *et al.*, 1994).

L'expression du VEGF est largement induite par l'hypoxie (Fergelot *et al.*, 2005 ; Roskoski, 2007), mais il s'accumule également précocement dans la rétine au cours du diabète, avant l'apparition de l'hypoxie rétinienne (Sone *et al.*, 1995 ; Segawa *et al.*, 1998).

La surexpression de VEGF observée en cas d'hyperglycémie pourrait être la conséquence directe de la réduction des flux sanguins, responsables d'une ischémie rétinienne (Koya *et al.*, 1998). Il est possible que la surexpression du VEGF soit un mécanisme de défense des cellules neurales de la rétine contre l'apoptose induite par l'hyperglycémie (Barber *et al.*, 2003).

Néanmoins, les données suggérant un rôle pathologique d'une surexpression précoce du VEGF dans la rétine contrastent avec plusieurs faits. Les modèles où une surexpression précoce du VEGF a été démontrée sont des modèles où l'on n'observe pas de rétinopathie proliférante en réponse à l'hyperglycémie. Par ailleurs, si l'on peut attribuer au VEGF un rôle important dans les phases précoces de la maladie, faites d'augmentation de perméabilité capillaire, ou dans les phases tardives, faites de prolifération vasculaire, plus de 10ans en

général séparent ces deux phases chez l'homme, et la rétinopathie proliférante ne s'observe qu'en réponse à une ischémie rétinienne considérable.

Enfin, plusieurs modèles décrivent plutôt un défaut d'expression du VEGF, en particulier en réponse à une ischémie du membre inférieur (**Rivard *et al.*, 1999**). Dans ce contexte, un travail récent a mis en évidence un défaut de production de VEGF par les fibroblastes de souris diabétiques (**Lerman *et al.*, 2003**). Il a cependant été montré qu'il existe une régulation différentielle de l'expression du VEGF, de sorte qu'elle peut être augmentée par l'hyperglycémie au niveau de la rétine et diminuée au niveau du myocarde (**Chou *et al.*, 2002**).

Dans ces conditions, si des anomalies d'expression du VEGF accompagnent très certainement les phases tardives de la rétinopathie diabétique, il est difficile, à ce jour, d'attribuer un rôle prépondérant à la seule dérégulation, par l'hyperglycémie et la carence en insuline, de l'expression du gène du VEGF dans la physiopathologie des complications vasculaires chez le diabétique (**Larger, 2003**).

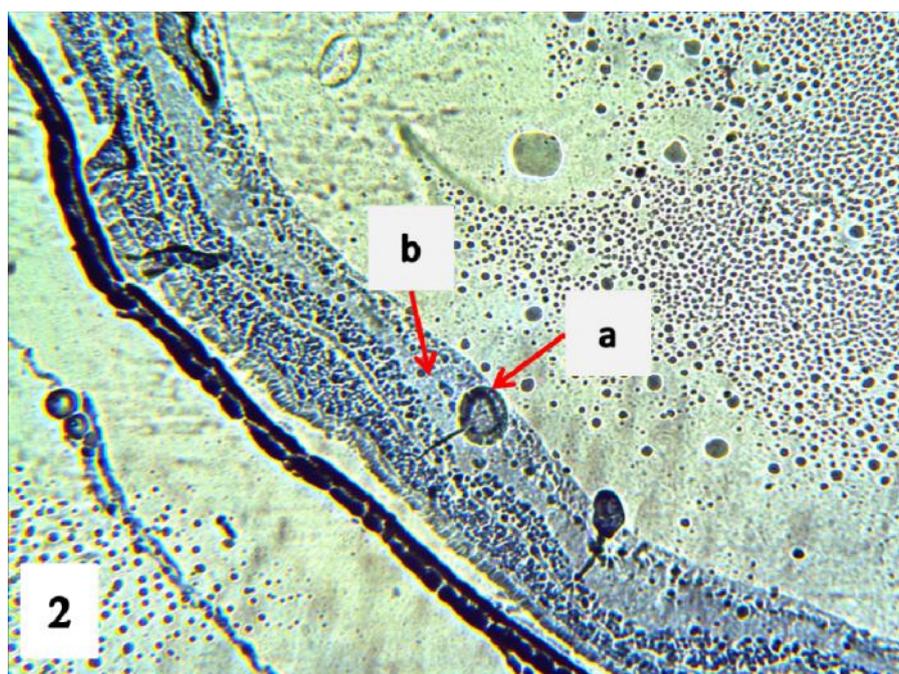
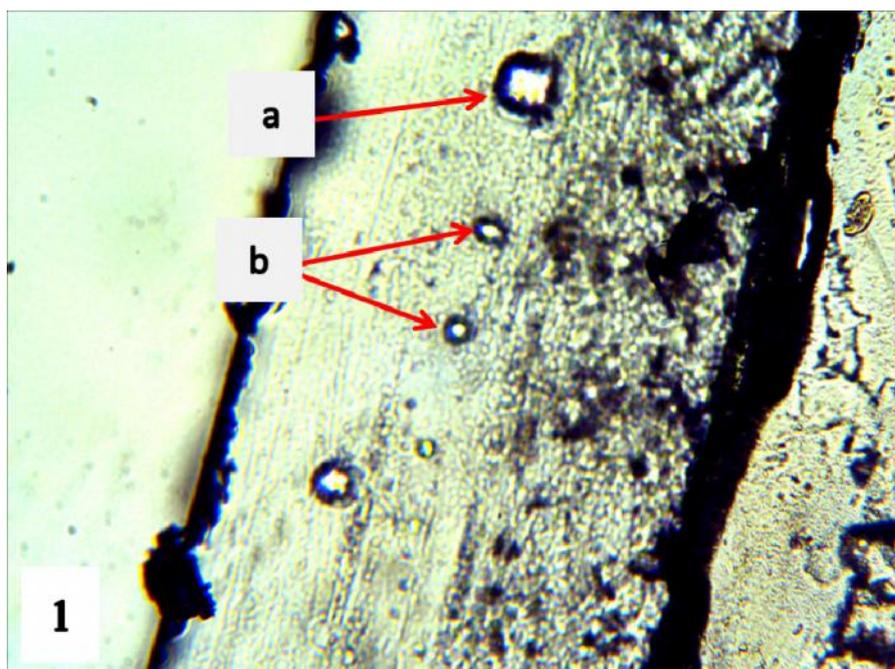


Planche VI : Coupe histologique de la rétine de *Psammomys obesus* marquée à la VE-cadhérine; G \times 400.

Figure 1 : Coupe histologique de la rétine de *Psammomys obesus* témoin marquée à la VE-cadhérine ; G \times 400.

- Au niveau de cette coupe nous observons la présence de vaisseaux sanguins mature de structure normale (a). Ces vaisseaux présentent une forte expression de la VE-cadhérine (a) (b) au niveau Po témoin.

Figure 2 : Coupe histologique de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique marquée à la VE-cadhérine ; G × 400.

- Sur cette coupe, nous constatons l'absence de l'expression de la VE-cadhérine au niveau d'un vaisseau dilaté (a), témoignant de la perte des jonctions entre les cellules endothéliales à un stade relativement avancé de la maladie.

- A ce stade on constate l'apparition de néo-vaisseaux (b) marquant le phénomène d'angiogenèse. Ces néovaisseaux sont négatifs au marquage de la VE-cadhérine, car ils ne possèdent pas encore de jonctions inter-endothéliales.

➤ **Discussion des résultats de l'immunomarquage à la VE-cadhérine de la Planche VI**

- L'immunomarquage de la VE-cadhérine nous a permis de caractériser une étape importante dans l'évolution de la RD : la perte des jonctions et migration des cellules endothéliales.

- Les coupes histologiques des rétines de Po témoins, ou ceux des rétines des Po diabétiques aux stades précoces présentent généralement une expression relativement intense de la VE-cadhérine, composante principale des jonctions inter-endothéliales, témoignant de l'intégrité vasculaire entre ces cellules.

- Au cours des stades avancés de la RD, nous constatons une perte des jonctions endothéliales, perte des contacts, permettant aux cellules endothéliales de migrer pour recréer un nouveau vaisseau suivant le processus d'angiogenèse.

Les jonctions adhérentes sont présentes dans tout le système vasculaire (**Dejana, 2004**). La protéine majeure de ces jonctions est la VE-cadhérine. En association avec ses partenaires cytoplasmiques qui la relient aux différents types de cytosquelette, elle élabore des jonctions solides et cohésives. Leur ouverture finement régulée permet à l'endothélium d'assurer sa fonction de barrière semi-perméable. En effet, elle est impliquée dans le contrôle de la

perméabilité et de l'intégrité vasculaire, l'angiogenèse, l'extravasation des leucocytes et des cellules tumorales (**Byrne *et al.*, 2005**).

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.

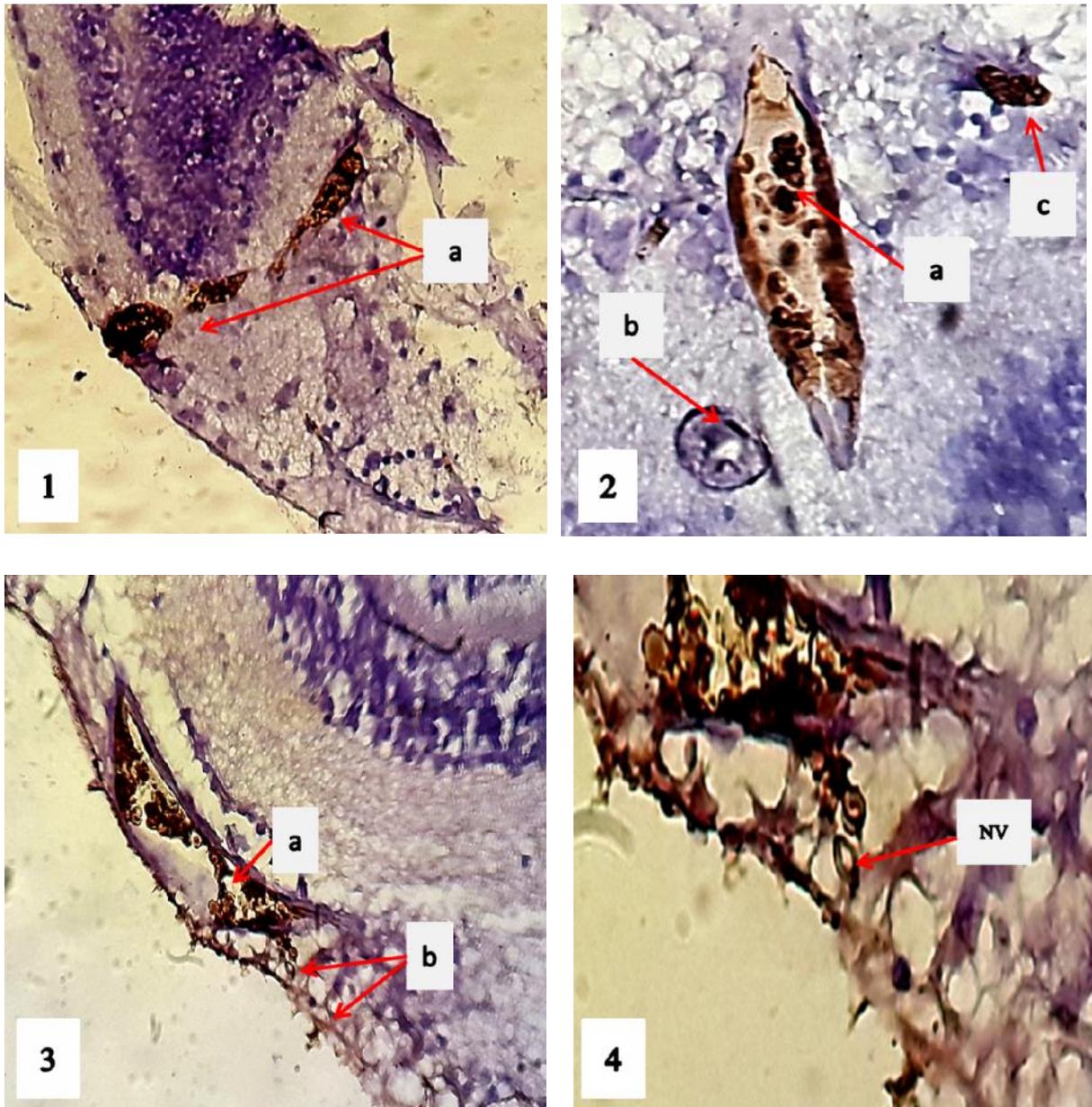


Planche VII : Coupes histologiques de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique marquées au CD31; G \times 50, G \times 400, G \times 400, G \times 400.

Figure 1 : Coupe histologique de *Psammomys obesus* diabétique (à 9 mois de RHC) marquée au CD31.

- Au niveau de cette coupe nous constatons la présence de grands vaisseaux dilatés et congestifs (a) dans un état ischémique présentant une forte expression au CD31.

Figure 2 : Coupe histologique de *Psammomys obesus* diabétique (à 9 mois de RHC) marquée au CD31.

- Cette coupe nous indique la présence d'un grand vaisseau hautement dilaté et fortement marqué par le CD31. Au sein de la lumière du vaisseau, nous pouvons observer la présence des éléments figurés du sang (a) marqués au CD31.
- Nous observons la présence d'un vaisseau sanguin (b) non dilaté, exprimant le CD31 au niveau membranaire, dont la lumière est non marquée.
- Un vaisseau relativement congestif est retrouvé au niveau de cette coupe (b).

Figure 3 : Coupe histologique de *Psammomys obesus* diabétique (à 9 mois de RHC) marquée au CD31.

- Cette coupe histologique met en évidence la présence d'un gros vaisseaux hautement dilaté, exprimant le CD31 au sein de sa lumière, qui indique la présence de plusieurs cellules CD31+.

Figure 4: Coupe histologique de *Psammomys obesus* diabétique (à 9 mois de RHC) marquée au CD31.

- Cette coupe histologique de la rétine des Po marquée au CD31, nous permet de mettre en évidence la présence de néo-vaisseaux à ce stade de la pathologie marqués au CD31. Ces néovaisseaux sont localisés à proximité du gros vaisseau dilaté.

➤ Discussion des résultats de l'immunomarquage au CD31 de la Planche VII

Le CD31 (ou PECAM-1= Molécule d'adhésion des plaquettes aux cellules endothéliales) est une protéine transmembranaire qui joue un rôle dans les interactions adhésives entre cellules endothéliales adjacentes et également entre leucocytes, monocytes et cellules endothéliales (Diapédèse/migration).

Le marquage au CD31 au niveau des coupes histologiques de la rétine de Po diabétique (à 9 mois de RHP) aurait mis en évidence une population de cellule endothéliale circulante qui adhère à l'endothélium lésée.

Ceci caractérise une phase pré-proliférative de la RD ; à ce niveau nous constatons la présence d'un gros vaisseau dilaté et ischémique au niveau duquel le marquage au CD31 aurait permit

la mise en évidence d'une population de cellule endothéliale circulante adhérees à l'endothélium lésé.

Ce marquage pourrait également indiquer la présence de cellules de la lignée immunitaire: monocyte, thrombocyte, leucocyte... recruté au niveau de l'endothélium dans un cadre inflammatoire (diapédèse/migrations). (Figure 3 (a))

Ces résultats sont corrélés aux observations cliniques de l'évolution de la RD chez l'Homme.

En effet, la RD proliférative est mis en évidence par la présence de nouveaux vaisseaux sanguins sur la surface du disque optique de la rétine conjuguée à une « ischémie rétinienne ». (**Mohamed Q et al., 2007**).

Au cours de la phase pré-proliférative de la RD, un épaissement de la membrane, et des capillaires étroits contribuent à « une thrombose », « une ischémie », et les premières anomalies détectables de la RDNP. En réponse à l'hypoxie résultante, des médiateurs solubles de l'angiogenèse, tels que le VEGF, sont libérés pour développer un apport de nutriments par la formation de tubes capillaires naissants (Figure 4 (NV)). Ces nouveaux vaisseaux sanguins sont hautement perméables et fragiles et sont facilement perturbés, provoquant des hémorragies et une perte de la vision caractéristique de la RDP (**Crawford et al., 2009**).

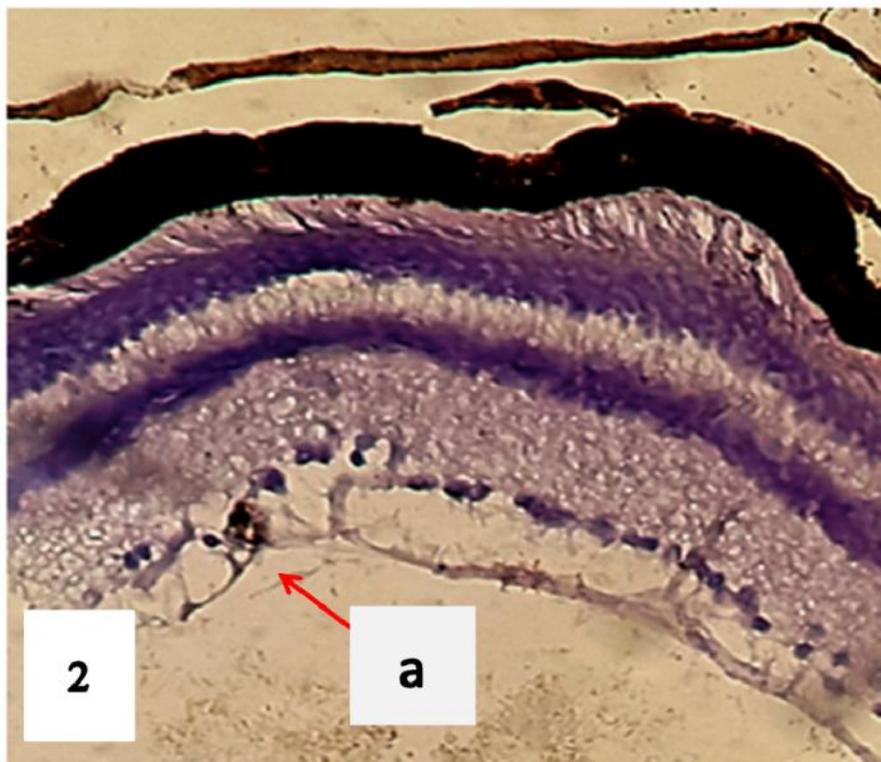
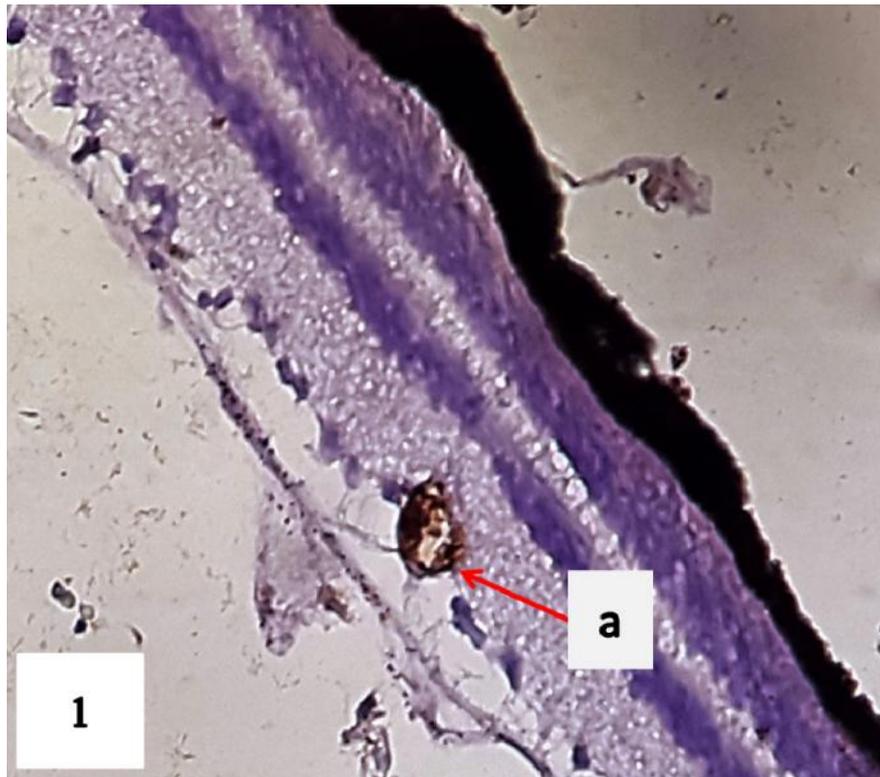


Planche VIII : Coupe histologiques de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique marquée au vWF; G × 50

Figure 1 : Coupe histologique de *Psammomys obesus* diabétique marquée au vWF.

- La figure 1 et 2 représente l'immunomarquage au vWF, qui permet de cibler les vaisseaux sanguins au niveau du tissu rétinien.

- Au niveau de ces coupes histologiques, nous pouvons observer la présence de vaisseaux sanguins de structure relativement dilaté, congestif, et fortement marqué au vWF. Ces vaisseaux mettent en évidence la présence de caillot sanguin au niveau de la lumière, adhérents à la paroi.

➤ Discussion des résultats de l'immunomarquage au vWF de la Planche VIII

Le facteur de von Willbrand (vWF) est exprimé à la fois dans les CE et les mégacaryocytes (Denis, 2002 ; Werner *et al.*, 1992). Il joue un rôle de médiateur dans l'adhésion plaquettaire et la formation du caillot sur les sites des lésions vasculaires.

Le facteur de von Willebrand est un des éléments nécessaire à l'hémostase primaire.

Il possède plusieurs rôles :

- Permettre l'adhésion des plaquettes au vaisseau lésé.
- Transporter le facteur VIII.

L'immunomarquage du vWF, nous a permis de localiser certains vaisseaux, d'aspect congestifs, Ils témoignent clairement de la présence d'un phénomène d'hémostase ; où la paroi endommagée d'un vaisseau sanguin est couverte d'un caillot de fibrine pour arrêter l'hémorragie.

Au cours d'une RD, L'hémostase est un des mécanismes qui assurent le maintien du sang à l'intérieur des vaisseaux et, en particulier, des phénomènes qui déterminent l'arrêt du saignement lorsqu'un vaisseau est blessé. Le vWF, est l'une des molécule clé impliquée dans ce mécanisme L'**hémostase** est l'ensemble des mécanismes qui assurent le maintien du sang à l'intérieur des vaisseaux et, en particulier, des phénomènes qui déterminent l'arrêt du saignement lorsqu'un vaisseau est blessé (Pipe, 2009).

Ceci a été ainsi démontré au niveau des coupes histologiques de la rétine de Po, où les vaisseaux marqués par le vWF, montrent clairement une hémostase : recrutement des thrombocytes, pour contenir le sang à l'intérieur des vaisseaux et diminuer le flux sanguin par coagulation en attendant la réparation du vaisseau lésé.

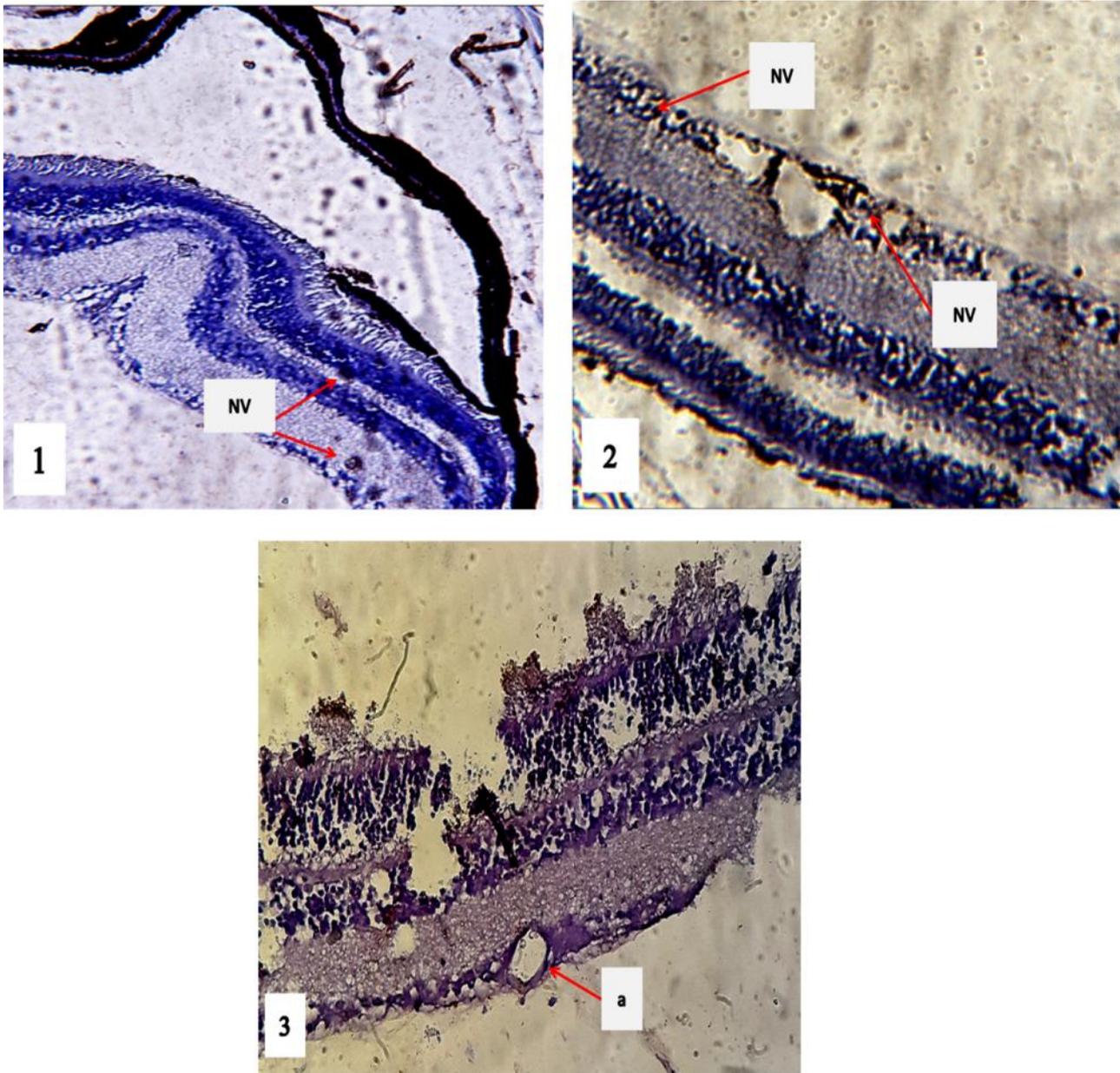


Planche IX : Coupe histologiques de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique marquée au CD34; G \times 50, G \times 400, G \times 400.

Figure 1 : Coupe histologique de *Psammomys obesus* diabétique (à 13 mois de RHC) marquée au CD34.

- Au niveau de cette coupe nous observons un remaniment des structures de la rétine.

- Cette coupe démontre la présence de plusieurs néovaisseaux anormaux localisés au niveau des différentes couches de la rétine témoignant du phénomène angiogénique au cours des stades avancés de la rétinopathie diabétique.

Figure 2 : Coupe histologique de la rétine de *Psammomys obesus* diabétique à 13 mois de RHC marquée au CD34.

Au niveau de cette coupe on constate la présence de plusieurs néovaisseaux situés tout au long de l'EP marqués au CD34 ; marqueur spécifique de la cellule endothéliale progénitrice immature, ces néovaisseaux (NV) sont très fins et peu structurés, ils sont constitués seulement d'un tube de cellules endothéliales. Ces NV sont localisés aux alentours d'un autre vaisseau dilaté négatif au marquage CD34.

Figure 3 : Coupe histologique de *Psammomys obesus* diabétique à 13 mois de RHC marquée au CD34

- Cette coupe nous indique la présence d'un gros vaisseau dilaté (a) qui n'a pas exprimé le marqueur CD34 ceci soutient le fait que le CD34 est spécifique aux cellules endothéliales progénitrices et ne s'exprime pas donc au niveau des cellules matures des anciens vaisseaux.

➤ Discussion des résultats de l'immunomarquage au CD34 de la Planche XI

Le CD34 est largement considéré comme un marqueur de cellules progénitrices endothéliales vasculaires (Fina *et al.*, 1990 ; Hristov *et al.*, 2008).

Nos résultats de l'immunomarquage du CD34 au niveau des rétines des Po diabétique aux stades les plus avancés de la RD, viennent appuyer le rôle du CD34 dans la caractérisation des CE progénitrices qui forment les néovaisseaux.

Nos observations affirment la présence d'un processus angiogénique, secondaire à une ischémie, au cours des stades avancés de la RD ; phase proliférative.

La RDP est mise en évidence par la présence de nouveaux vaisseaux sanguins sur la surface du disque optique de la rétine conjuguée à une ischémie rétinienne. (Mohamed *et al.*, 2007). Ces nouveaux vaisseaux sanguins deviennent problématiques parce qu'ils sont fragiles et très perméables. Ils percent le disque optique et poussent le long de la surface de la rétine et dans l'échafaudage de la face postérieure de la hyaloïde. Les vaisseaux eux-mêmes ne nuisent

pas à la vision, mais sont perturbés facilement par la traction du vitré et provoque une hémorragie dans la cavité vitréenne ou dans l'espace prérétinien. (**Crawford et al., 2009**).

La néovascularisation est également associée à une composante fibreuse qui, une fois contractée, peut conduire à un décollement de la rétine. Cette étape de la RDP est la plus grande menace à la perte de vision. La figure 2 montre la représentation schématique de la progression de la rétinopathie diabétique. (**Tang et Kern, 2011**)

Ceci nous permet de répondre relativement à nos interrogations de départ concernant l'évolution du processus angiogénique au cours d'une rétinopathie diabétique, secondaire à un DT2, chez un animal model nutri-induit pendant une période de 13 mois.

Notre étude nous permet d'appuyer les résultats déterminés en clinique, sur les complications vasculaire secondaire à une hyperglycémie chronique.

De multiples altérations cellulaires et moléculaires ont été décrites, dans les conditions d'hyperglycémie in vitro, dans des modèles de diabète chez des rongeurs ou encore chez des patients diabétiques. Ces altérations sont toutes susceptibles de participer aux anomalies de l'angiogenèse, observées chez les diabétiques, mais pas toujours dans le même sens (**Larger, 2003**).

Psammomys obesus est un model du DT2, qui développe une RD suite à une hyperglycémie chronique induite par un RHC. Ce model reproduit les altérations structurales et fonctionnelles des complications vasculaires rétiniennes secondaire à une RD humaine (clinique). Il représente ainsi un model pertinent pour l'étude de l'évolution des complications vasculaires rétiniennes post-RD, et pour l'étude des effets de l'hyperglycémie chronique sur le phénomène d'angiogenèse.

Conclusion & Perspectives

Les complications vasculaires, conséquences de l'hyperglycémie chronique, sont responsables de l'essentiel de la morbidité et de la mortalité chez les patients diabétiques.

La cible principale de la toxicité chronique de l'hyperglycémie est la cellule endothéliale vasculaire. L'ischémie secondaire aux lésions vasculaires déclenche une réponse angiogénique. Chez le diabétique, cette réponse angiogénique à l'ischémie diffère selon le tissu en cause, excessive dans certains organes comme la rétine, elle est le plus souvent déficiente ailleurs.

Les événements déclenchant les processus angiogéniques sont maintenant bien caractérisés. Un rôle central est reconnu au stress métabolique, qui s'exprime en grande partie par la régulation des facteurs de transcription sensibles à l'hypoxie HIF (hypoxia-inducible factor), et aux facteurs mécaniques tels qu'une variation de pression ou de flux. Enfin, dans la plupart des circonstances, une inflammation locale paraît nécessaire.

L'angiogenèse nécessite l'intervention coordonnée de multiples facteurs qui interviennent dans les différentes étapes aboutissant à la formation d'un nouveau vaisseau.

Nous avons souhaité montrer la complexité de l'analyse des effets du diabète sur l'angiogenèse, et les implications de ces effets sur l'évolution des complications vasculaires.

La poursuite des études sur les interactions hyperglycémie/angiogenèse devra prendre en compte l'hétérogénéité des cellules endothéliales, les interactions entre cellules endothéliales et cellules circulantes, entre les facteurs de croissance vasculaires et leurs inhibiteurs, et l'orchestration fine des moments de leur entrée en action au cours des événements conduisant à la formation des nouveaux vaisseaux et à l'ouverture des vaisseaux collatéraux.

Les futurs essais thérapeutiques de stimulation/inhibition de l'angiogenèse ne se limiteront probablement pas à l'administration, respectivement, d'un seul facteur de croissance ou d'un inhibiteur, mais feront probablement appel à des stratégies d'administration coordonnées de plusieurs des acteurs de l'angiogenèse. D'où l'intérêt d'étudier ces mécanismes et l'implication des différents facteurs angiogéniques, afin de développer des thérapies ciblées... !

Références bibliographiques

- 1- [AAO] American Academy of Ophthalmology 2003. Diabetic retinopathy preferred practice pattern. Accessed Nov 24, 2006.
- 2- Adamis AP, Berman AJ. Immunological mechanisms in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Seminars in immunopathology*. 2008. 30:65–84.
- 3- Adamis AP. Targeting angiogenesis, the underlying disorder in neovascular age-related macular degeneration. *Can J Ophthalmol*. 2005.40:352-68.
- 4- Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med*. 1994; 331(22): 1480-7.
- 5- Albelda, S. M., and C. A. Buck. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB*. 1990. (Fed. Am. Soc. Exp. Biol.) J. 4:2868-2880.
- 6- Albelda, S. M., P. Oliver, L. Romer, and C. A. Buck. 1990. EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule. *J. Cell Biol*. 110:1227-1237
- 7- Ashton N, Bowman. The blood-retinal barrier and vaso-glial relationships in retinal disease. *Trans Ophthalmol Soc U K*. 1965. 85:199-230.
- 8- ATLAS du DIABÈTE de la FID. 6e édition. 2013.
- 9- Barber AJ. A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003; 27: 283-90.
- 10- Baumhater S, Singer MS, Henzel W, Hemmerich S, Renz M, Rosen SD, Lasky LA. Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science*. 1993. 262:436–438.
- 11- Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev*. 2004. 84(3):869-901.
- 12- Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 2003. 3(6): p. 401-10.
- 13- Bhisitkul RB. Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments. *Br J Ophthalmol*, 2006.90:1542-7.
- 14- Broman M.T., Kouklis P., Gao X., Ramchandran R., Neamu R.F., Minshall R.D., Malik A.B. Cdc42 regulates adherens junction stability and endothelial permeability by inducing alpha-catenin interaction with the vascular endothelial cadherin complex. *Circ*. 2006. Res. 98:73–80
- 15- Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH . Angiogenic and cell survival functions of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). *J Cell Mol Med*. 2005. 9(4):777-94.

- 16- Carl L. Reiber et Iain J. McGaw. A Review of the “Open” and “Closed” Circulatory Systems: New Terminology for Complex Invertebrate Circulatory Systems in Light of Current Findings. *International Journal of Zoology*. 2009. Article ID 301284, 8 pages.
- 17- Carmeliet P, Ng YS, Nuyens D, Theilmeier G, Brusselmans K, Cornelissen I, Ehler E, Kakkav VV, Stalmans I, Mattot V, Perriard JC, Dewerchin M, Flameng W, Nagy A, Lupu F, Moons L, Collen D, D'Amore PA, Shima DT. Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med*. 1999. 5(5):495-502.
- 18- Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Jun*. 2003. 9(6):653-60.
- 19- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 2000. 6(4): p. 389-95.
- 20- Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005. 438 (7070): p. 932-6.
- 21- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 1996. 380(6573):435-9.
- 22- Chaturvedi N, Sjolie AK, Stephenson JM, Abrahamian H, Keipes M, Castellarin A, Rogulja-Pepeonik Z, Fuller JH. Effect of lisinopril on progression of retinopathy in normotensive people with type 1 diabetes. *Lancet*. 1998. 351:28–31.
- 23- Chou E, Suzuma I, Way KJ, et al. Decreased cardiac expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in insulinresistant and diabetic states: a possible explanation for impaired collateral formation in cardiac tissue. *Circulation* 2002; 105: 373-9.
- 24- Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol*. 1984;133:157–165.
- 25- Cleaver O, Melton DA. Endothelial signaling during development. *Nat Med*. 2003. 9 (6):661-668.
- 26- Couffinhal T, Dufourcq P, Daret D, Duplaà C. The mechanisms of angiogenesis. Medical and therapeutic applications. *Rev Med Interne*. 2001. 22(11): p. 1064-82.
- 27- Crawford TN, Alfaro DV, Kerrison JB, Jablon EP. Diabetic retinopathy and angiogenesis. *Curr Diabetes Rev*. 2009. 5(1):8–13.

- 28-Davignon J et Ganz P. Atherosclerosis: Evolving Vascular Biology and Clinical Implications Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation*. 2004; 109: III-27-III-32
- 29-Deindl E. Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit. *Circ Res*, 2001. 89(9): p. 779-86.
- 30-Dejana E. Endothelial cell–cell junctions: happy together. *Nat Rev MCB*. 2004.5, 261-270.
- 31-Denis CV. Molecular and cellular biology of von Willebrand factor. *Int J Hematol*. 2002 Jan;75(1):3-8.
- 32-Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1993. 329:977–986.
- 33-Diabetic Retinopathy Study Research Group. Report 6: design, methods, and baseline results. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.1981.21:149-209.
- 34-Donath MY, Gross DJ, Cerasi E, Kaiser N. Hyperglycemia-induced beta-cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes. *Diabetes*. 1999 Apr; 48 (4): 738-44.
- 35-Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E et Risau W. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cel*.1998.1 Sci 111, 1853-1865.
- 36-Félétou M, Huang Y, et Vanhoutte PM. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol*. 2011. 164(3): 894–912.
- 37-Felschow DM, McVeigh ML, Hoehn GT, Civin CI, Fackler MJ. The adapter protein CrkL associates with CD34. *Blood*. 2001. 97:3768–3775.
- 38-Fergelot P, Rioux-Leclercq N, Patard JJ. Molecular pathways of tumour angiogenesis and new targeted therapeutic approaches in renal cancer. *Prog Urol*.2005.15(6):10219.
- 39-Ferguson JE, Kelley RW, Patterson C. Mechanisms of endothelial differentiation in embryonic vasculogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2005. 25(11):2246-54.
- 40-Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996. 380(6573):439-42.
- 41-Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003. 9 (6):669-676.

- 42-Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989. 161 (2):851-858.
- 43-Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer.* 2002. 2 (10):795-803.
- 44-Figueroa XF, Isakson BE et Duling BR. Connexins: gaps in our knowledge of vascular function. *Physiology (Bethesda).* 2004.19, 277-284.
- 45-Figueroa XF, Isakson BE et Duling BR. Vascular gap junctions in hypertension. *Hypertension.* 2006. 48, 804-811
- 46- Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood.* 1990. 75(12):2417-26.
- 47-Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1995. 1(1):27-31.
- 48-Fong DS, Aiello L, Gardner TW, King GL, Blankenship G, Cavallerano JD, Ferris FL 3rd, Klein R; American Diabetes Association. Retinopathy in diabetes. *Diabetes Care.* 2004 Jan;27 Suppl 1:S84-7.
- 49-Friedlander M. Fibrosis and diseases of the eye. *J Clin Invest.* 2007;117(3):576-86.
- 50-Gavard J, Gutkind JS. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol.* 2006.8(11):13-34.
- 51-Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller GA, Rangell L, Wright BD, Radtke F, Aguet M, Ferrara N. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development.* 1999. 126(6):1149-59.
- 52-Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014.103(2):137-49.
- 53-Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, Wion KL, Chen EL, Eaton HD, Vehir GA, Capon DJ & Lawn RM. Characterization of the human factor VIII gene. **Nature.** 1984.312, 326 – 330.
- 54-Grazia Lampugnani, M. et al. Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, beta-catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *J. Cell Biol.* 2003.161, 793-804

- 55-Healy L, May G, Gale K, Grosveld F, Greaves M, Enver T. The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hematopoietic cell adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995;92:12240–12244.
- 56-Heil M, Schaper W. Insights into pathways of arteriogenesis. *Curr Pharm Biotechnol.* 2007. 8:35–42.
- 57-Hirschi KK, D'Amore PA. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res.* 1996;32:687–698.
- 58-Hirschi KK, Rohovsky SA, Beck LH, Smith SR, D'Amore PA. Endothelial cells modulate the proliferation of mural cell precursors via platelet-derived growth factor-BB and heterotypic cell contact. *Circ Res.* 1999;84:298–305.
- 59-Ho TK, Rajkumar V, Ponticos M, Leoni P, Black DC, Abraham DJ, Baker DM. Increased endogenous angiogenic response and hypoxia-inducible factor-1alpha in human critical limb ischemia. *J Vasc Surg.* 2006. 43(1):125-33.
- 60-Hoeben A , Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. *Pharmacol Rev.* Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. 2004.5(4):5-80.
- 61-Hristov M, Fach C, Becker C, *et al.* Reduced numbers of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease associated with long-term statin treatment. *Atherosclerosis*, 192 (2007), pp. 413–420.
- 62-Huttner WB, Schiebler W, Greengard P, De Camilli P. Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. *J Cell Biol.* 1983.96(5):1374-88.
- 63-Ilan N, Madri JA. PECAM-1: old friend, new partners. *Curr Opin Cell Biol.* 2003.15(5):515-24.
- 64-International Diabetes Federation. Diabetes atlas 2005. <http://www.eatlas.idf.org>
- 65-Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med.* 2003. 9 (6):685-693.
- 66-Kahle W, Frotscher M. Atlas de poche d'anatomie. Soins.2007. Vol 52,N°712. P20
- 67-KAISER PK. Antivascular endothelial growth factor agents and their development: therapeutic implications in ocular diseases. *Am J Ophthalmol*, 2006.142:660-8.
- 68-Kaul H, Riazuddin SA, Yasmeen A, Mohsin S, Khan M, Nasir IA, Khan SN, Husnain T, Akram J, Hejtmancik JF, Riazuddin S. A new locus for autosomal recessive congenital cataract identified in a Pakistani family. *Mol Vis.* 2010 Feb 16;16:240-5.
- 69-Kern TS. Contributions of inflammatory processes to the development of the early stages of diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res.* 2007. 2007:95103.

- 70-Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. XV. The long term incidence of macular edema. *Ophthalmology*. 1995.102 : 7-16 Klein et al., 1995
- 71-Kowluru Renu A. et Chan Pooi-See. Oxidative Stress and Diabetic Retinopathy. *Exp Diabetes Res*. 2007; 2007: 43603.
- 72-Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*. 1998; 47: 859-66.
- 73-Larabi Y, Dahmani Y, et al. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the retina of the diabetic sand rat *Psammomys obesus*. *J Hirnforsch*. 1991; 32(4):525-31.
- 74-Larger E. Hyperglycemia and angiogenesis. *Med Sci (Paris)*. 2003;19(8-9):840-6.
- 75-Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood*. 1998.92(11):3983-96.
- 76-Lerman OZ, Galiano RD, Armour M, Levine JP, Gurtner GC. Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia. *Am J Pathol*. 2003; 162: 303-12.
- 77-Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem*. 1995; 270(22): 13333-40.
- 78-Lollar P. The association of factor VIII with von Willebrand factor. *Mayo Clin Proc*. 1991. 66(5):524-34.
- 79-Luscher TF et Noll G. The endothelium in coronary vascular control. *Hearth Dis*. 1995. 1-10.
- 80-Mackie AR, Losordo DW. CD34-positive stem cells: In the treatment of heart and vascular disease in human beings. *Tex Heart Inst J*. 2011. 38:474-485.
- 81-Massin Pascale, Gaudric Alain, Dupas Bénédicte. *Pathologie vasculaire du fond d'oeil / Rétinopathie diabétique (volume 3 - coffret rétine)*. Lavoisier, 5 mai 2014 - 280 pages.
- 82-Marquie G, Hadjiiski P, Arnaud O, Duhault J. Development of macro angiopathy in sand rats (*Psammomys obesus*), an animal model of non-insulin-dependent diabetes mellitus: Effect of gliclazide. *Am J Med*.1991. 90(Suppl 6A):55-61.
- 83-Marquie G, Duhault J, Espinal J, Petkov P, Jablenska R, Khallayoun S, Bennani N. A novel agent for the treatment of insulin resistance. *Studies on Psammomys obesus*. Effect on pancreatic islets of insulin resistant animals. *Cell Mol Biol*.1997. 43:243-251.

- 84-Matthews DR, Stratton IM, Aldington SJ, Holman RR, Kohner EM, UK Prospective Diabetes Study Group. Risks of progression of retinopathy and vision loss related to tight blood pressure control in type 2 diabetes mellitus. *Arch Ophthalmol*. 2004. Vo.122, no. 11, pp. 1631–1640.
- 85- Mendes-Jorge L, Ramos D, Luppó M, Llombart C, Alexandre-Pires G, Nacher V. Scavenger function of resident autofluorescent perivascular macrophages and their contribution to the maintenance of the blood-retinal barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009. 50(12):5997-6005.
- 86-Miller JW, Adamis AP, Aiello LP. Vascular endothelial growth factor in ocular neovascularization and proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Metab Rev*. 1997; 13(1): 37-50.
- 87-Miwa K, Nakamura J, Hamada Y, Naruse K, Nakashima E, Kato K, et al. The role of polyol pathway in glucose-induced apoptosis of cultured retinal pericytes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2003; 60(1): 1-
- 88-Mohamed Q, Gillies MC, Wong TY. Management of diabetic retinopathy: a systematic review. *JAMA*. 2007; 298(8):902–916.
- 89-Murata T, Nakagawa K, Khalil A, Ishibashi T, Inomata H, Sueishi K. The relation between expression of vascular endothelial growth factor and breakdown of the blood-retinal barrier in diabetic rat retinas. *Lab Invest*. 1996; 74(4): 819-25.
- 90-Nielsen JS, McNagny KM. CD34 is a key regulator of hematopoietic stem cell trafficking to bone marrow and mast cell progenitor trafficking in the periphery. *Microcirculation*. 2009. 16:487–496.
- 91-Nollet F, Kools P, van Roy F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol*. 2000. 299(3):551-72.
- 92-OMS. Maladies oculaires prioritaires:Rétinopathie diabétique.pages7, 2015, [en ligne]. <http://www.who.int/blindness/causes/priority/fr/index6.html>.
- 93-Patte M, I. Sillaire, E. Pauchard, L.M. Coulangeon, B. Kantelip, F. Bacin. Barrières hémato-oculaires. *Physiologie. OPHTALMOLOGY*. 2007. [21-020-D-20].
- 94-Perez-Moreno M, Fuchs E.Catenins: keeping cells from getting their signals crossed. *Dev Cell*. 2006 Nov;11(5):601-12.
- 95-Plutzky J. Emerging epigenetic maps in atherosclerosis. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014. 7(5):573-5.

- 96-Pournaras C.J. Pathologies vasculaires oculaires. Société française d'ophtalmologie. 2008. Masson, 807p.
- 97-Powell ED, Field RA. DIABETIC Retinopathy And Rheumatoid Arthritis. *Lancet*. 1964 Jul 4;2(7349):17-8.
- 98-Przemyslaw Sapielha, Jean-Sebastien Joyal, José Carlos Rivera, Elsa Kermorvant-Duchemin, Florian Sennlaub, Pierre Hardy, Pierre Lachapelle, and Sylvain Chemtob. Retinopathy of prematurity: understanding ischemic retinal vasculopathies at an extreme of life. *J Clin Invest*. 2010 Sep 1; 120(9): 3022–3032.
- 99-Racah D, Conrath J, Giorgi R, et Ridings B. Foveal avascular zone in diabetic retinopathy: quantitative vs qualitative assessment. *Eye*. 2004. 19, 322–326.
- 100- Reichenbach A, Wurm A, Pannicke T, Iandiev I, Wiedemann P, Bringmann A. Muller cells as players in retinal degeneration and edema. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2007. 245(5):627-36.
- 101- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997. 386(6626):671-4.
- 102- Rivard A, Silver M, Chen D, et al. Rescue of diabetes related impairment of angiogenesis by intramuscular gene therapy with adeno-VEGF. *Am J Pathol*. 1999; 154: 355-63.
- 103- Roskoski R JR, Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2007. 62(3): p. 179-213.
- 104- Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD et Beyer EC. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol*. 2003.Rev.83, 1359-1400.
- 105- Saidi T, R. Ben Chaouacha-Chekir and D. Hicks. Advantages of Psammomys obesus as an Animal Model to Study Diabetic Retinopathy. *Diabetes & Metab*. 2012. 3:6.
- 106- Saïdi T, Mbarek S, Omri S, Behar-Cohen F, Chaouacha-Chekir RB, Hicks D. The sand rat, Psammomys obesus, develops type 2 diabetic retinopathy similar to humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Nov 21;52(12):8993-9004.
- 107- Saraux H, Lemasson C. Anatomie et histologie de l'œil, chap 12. Thème *d'Anatomie et histologie de l'oeil 2°Ed*. 1982. p169-188.
- 108- Segawa Y, Shirao Y, Yamagishi S, Higashide T, Kobayashi M, Katsuno K, et al. Upregulation of retinal vascular endothelial growth factor mRNAs in spontaneously diabetic rats without ophthalmoscopic retinopathy. A possible

- participation of advanced glycation end products in the development of the early phase of diabetic retinopathy. *Ophthalmic Res.* 1998; 30(6): 333-9.
- 109- Shakib M, Cunha-Vaz JG. Studies on the permeability of the blood-retinal barrier. IV. Junctional complexes of the retinal vessels and their role in the permeability of the blood-retinal barrier. *Exp Eye Res.* 1966. 5(3):229-34.
- 110- Schaper W, Scholz D. Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1143–1151.
- 111- Schimmenti LA, Yan HC, Madri JA, Albelda SM. Platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1, modulates cell migration. *J Cell Physiol.*1992. 153:417–428.
- 112- Smardo FL, Jr, Burg MB, Garcia-Perez A. Kidney aldose reductase gene-transcription is osmotically regulated. *Am J Physiol.* 1992.262:C776–C782.
- 113- Söhl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res.* 2004.62(2):228-32.
- 114- Sone H, Kawakami Y, Okuda Y, Sekine Y, Honmura S, Matsuo K, et al. Ocular vascular endothelial growth factor levels in diabetic rats are elevated before observable retinal proliferative changes. *Diabetologia.* 1997; 40(6): 726-30.
- 115- Stewart A. et Ramon F. *Rod Vision: Pathways and Processing in the Mammalian Retina.* Progress in Retinal and Eye Research. 2001. vol. 20, n^o 3, p. 351-384.
- 116- Sun YM, Su Y, Li J, Wang LF. Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013. 433(4):359-61.
- 117- Sun G, Birkey SM, Hulett FM. Three two-component signal-transduction systems interact for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 1996 Mar;19(5):941-8.
- 118- Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua SH, and Hopkinson A. Concise Review: Evidence for CD34 as a Common Marker for Diverse Progenitors. *Stem Cells.* 2014. 32(6): 1380–1389.
- 119- Stewart A, Ramon F. "Rod Vision: Pathways and Processing in the Mammalian Retina". *Progress in Retinal and Eye Research.*2001. 20 (3): 351–384.
- 120- Tang J, Kern TS. Inflammation in Diabetic Retinopathy. *Prog Retin Eye Res.* 2011. 30(5):343-58.

- 121- UK Prospective Diabetes Study Group Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes. UK Prospective Diabetes Study Group. *Bmj*. 1998. 317:703–713.
- 122- van de Rijn M, Lombard CM, Rouse RV. Expression of CD34 by solitary fibrous tumors of the pleura, mediastinum, and lung. *Am J Surg Pathol*. 1994 Aug;18(8):814-20.
- 123- Vehar GA, Keyt B, Eaton D, Rodriguez H, O'Brien DP, Rotblat F, Oppermann H, Keck R, Wood WI, Harkins RN, Tuddenham EG, Lawn RM, Capon DJ. Structure of human factor VIII. *Nature*. 1984.22-28;312(5992):337-42.
- 124- Weiss SW, Nickoloff BJ. CD-34 is expressed by a distinctive cell population in peripheral nerve, nerve sheath tumors, and related lesions. *Am J Surg Pathol*. 1993.17(10):1039-45.
- 125- Werner EJ, Abshire TC, Giroux DS, Tucker EL, Broxson EH. Relative value of diagnostic studies for von Willebrand disease. *J Pediatr*. 1992 Jul;121(1):34-8.
- 126- White NH, Cleary PA, Dahms W. Beneficial effects of intensive therapy of diabetes during adolescence: Outcomes after the conclusion of the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). *The Journal of Pediatrics*. 2001. vol. 139, no. 6, pp. 804–812.
- 127- Wolff SP et Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J*. 1987.245(1): 243–250.
- 128- Yang Y, Hayden MR, Sowers S, Bagree SV, Sowers JR. Retinal redox stress and remodeling in cardiometabolic syndrome and diabetes. *Oxid Med Cell Longev*. 2010; 3(6): 392-403.
- 129- Yang JK, Liu W, Shi J, Li YB. An association between subclinical hypothyroidism and sight-threatening diabetic retinopathy in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2010 May;33(5):1018-20.
- 130- Zanetta L, Marcus SG, Vasile J, Dobryansky M, Cohen H, Eng K *et al.* (2000). Expression of Von Willebrand factor, an endothelial cell marker, is up-regulated by angiogenesis factors: a potential method for objective assessment of tumor angiogenesis. *Int J Cancer* 85: 281–288.
- 131- Zhou X, Stuart A, Dettin LE, Rodriguez, G., Hoel B, et Gallicano GI. Desmoplakin is required for microvascular tube formation in culture. *Journal of Cell Science*. 2004.117, 3129-3140.

- 132- Zoltowska M., Ziv E., Delvin E. *et al.* — Circulating lipoproteins and hepatic sterol metabolism in *Psammomys obesus* prone to obesity, hyperglycemia and hyperinsulinemia. *Atherosclerosis* , 2001, *157*, 85-96
- 133- Zoltowska M., Delvin E., Ziv E. *et al.* — Impact of *in vivo* glycation of LDL on platelet aggregation and monocyte chemotaxis in diabetic *psammomys obesus*. *Lipids*. 2004, *39*, 81-85.
- 134- Zoltowska M., St-Louis J., Ziv E. *et al.* — Vascular responses to alpha-adrenergic stimulation and depolarization are enhanced in insulin-resistant and diabetic *Psammomys obesus*. *Can. J. Physiol Pharmacol.* , 2003, *81*, 704-710.
- 135-

Annexes

ANNEXE I

1- Diabète : Complications et prévalence

Le diabète est une maladie métabolique chronique qui apparaît lorsque le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline ou que l'organisme n'utilise pas correctement l'insuline qu'il produit. L'hyperglycémie, est un effet fréquent du diabète non contrôlé qui conduit avec le temps à des atteintes graves de nombreux systèmes organiques et plus particulièrement des nerfs et des vaisseaux sanguins. (OMS, 2015).

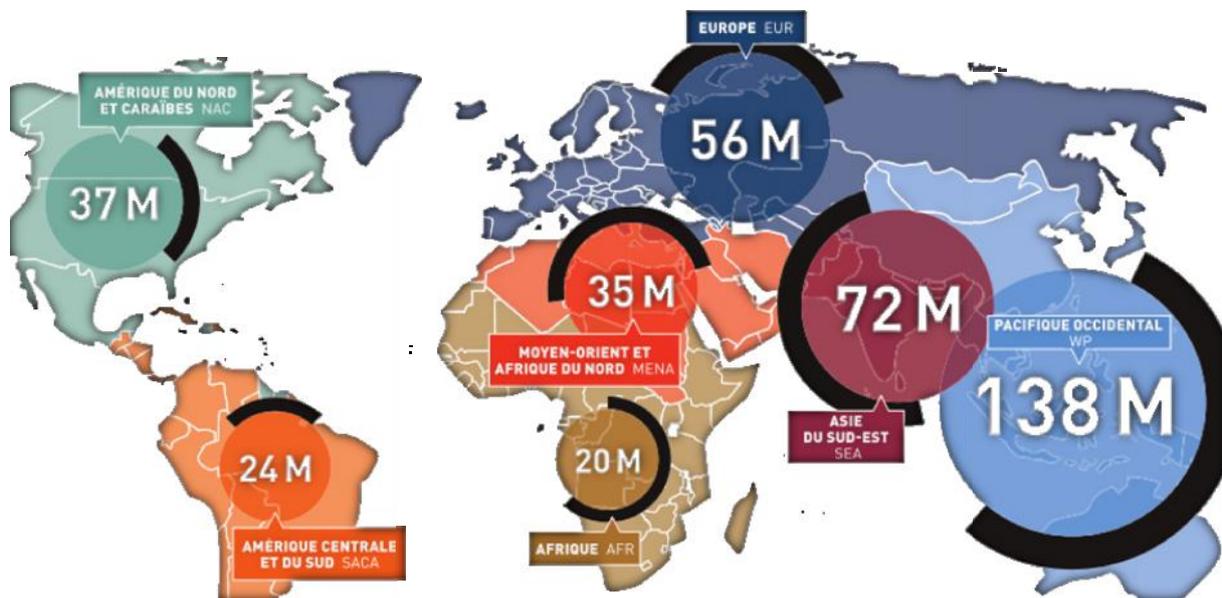


Figure 30 : Nombre de personnes atteintes de diabète dans le monde (FID, 2013).

➤ Diabète de type 1

Le diabète de type 1 (précédemment connu sous le nom de diabète insulino-dépendant ou juvénile) est caractérisé par une production insuffisante d'insuline et exige une administration quotidienne de cette dernière. Il est provoqué par une réaction auto-immune au cours de laquelle les propres défenses de l'organisme attaquent les cellules bêta du pancréas qui produisent l'insuline. L'organisme devient alors incapable de fabriquer l'insuline dont il a besoin. La cause de diabète de type 1 n'est pas connue, et en l'état des connaissances actuelles. (Guariguata *et al.*, 2013).

➤ **Diabète de type 2**

Le diabète de type 2 (précédemment appelé diabète non insulino-dépendant ou diabète de la maturité) résulte d'une mauvaise utilisation de l'insuline par l'organisme. Le diabète de type 2 représente 90% des diabètes rencontrés dans le monde. Il est en grande partie le résultat d'une surcharge pondérale et de la sédentarité. Ses symptômes peuvent être les mêmes que ceux du diabète de type 1 mais sont souvent moins marqués. De ce fait, la maladie peut être diagnostiquée plusieurs années après son apparition, une fois les complications déjà présentes. (OMS, 2015).

➤ **Diabète gestationnel**

Il se caractérise par une hyperglycémie, apparaissant pendant la grossesse. Les femmes ayant un diabète gestationnel ont un risque accru de complications pendant la grossesse et à l'accouchement. Leur risque d'avoir un diabète de type 2 à un stade ultérieur de leur vie augmente également. (OMS, 2015).

➤ **Complications du diabète**

Avec le temps, le diabète peut endommager le cœur, les vaisseaux sanguins, les yeux, les reins et les nerfs. (OMS, 2015).

- Le diabète augmente le risque de cardiopathie et d'accident vasculaire cérébral. Selon une étude conduite dans plusieurs pays, 50% des diabétiques meurent d'une maladie cardio-vasculaire (principalement cardiopathie et accident vasculaire cérébral).
- Associée à une diminution du débit sanguin, la neuropathie qui touche les pieds augmente la probabilité d'apparition d'ulcères des pieds, d'infection et, au bout du compte, d'amputation des membres.
- La rétinopathie diabétique est une cause importante de cécité et survient par suite des lésions des petits vaisseaux sanguins (micro-angiopathies) de la rétine qui s'accumulent avec le temps. Un pour cent de la cécité dans le monde peut être attribuée au diabète.
- Le diabète figure parmi les principales causes d'insuffisance rénale.

- Le risque général de décès chez les diabétiques est au minimum deux fois plus important que chez leurs pairs qui n'ont pas de diabète.

➤ **Prévalence du diabète**

En 2014, 9% de la population adulte (18 ans et plus) était diabétique. En 2012, le diabète a été la cause directe de 1,5 million de décès. Plus de 80% des décès par diabète se produisent dans des pays à revenu faible ou intermédiaire. (OMS, 2015).

Les dernières estimations de la FID indiquent que 8,3 % d'adultes – 382 millions de personnes – sont atteints de diabète et le nombre de personnes atteintes de cette maladie est supposé dépasser les 592 millions dans moins de 25 ans. Pourtant, avec 175 millions de cas non diagnostiqués à l'heure actuelle, nombreuses sont les personnes atteintes de diabète qui s'exposent à des complications sans le savoir. De surcroît, avec 80 % du nombre total de personnes atteintes dans les pays à faible et moyen revenu, où l'épidémie s'amplifie à une vitesse alarmante, les derniers chiffres de l'Atlas du Diabète de la FID donnent une indication inquiétante de l'impact futur du diabète en tant que menace majeure pour le développement mondial.

RÉGION DE LA FID	2013 MILLIONS	2035 MILLIONS	HAUSSE %
● Afrique	19,8	41,4	109%
● Moyen-Orient et Afrique du Nord	34,6	67,9	96%
● Asie du Sud-Est	72,1	123	71%
● Amérique centrale et du Sud	24,1	38,5	60%
● Pacifique occidental	138,2	201,8	46%
● Amérique du Nord et Caraïbes	36,7	50,4	37%
● Europe	56,3	68,9	22%
Monde	381,8	591,9	55%

Tableau 2 : Régions de la FID et projections mondiales concernant le nombre de personnes atteintes de diabète (20-79 ans), 2013 et 2035

2- Hypothèses de la pathogenèse de la rétinopathie diabétique

➤ Hypothèse d'hémodynamique

Plusieurs auteurs suggèrent que les modifications structurales microvasculaires observées très tôt au cours du diabète ont pour origine des perturbations hémodynamiques. L'hyperglycémie induirait en effet une perte de l'autorégulation rétinienne du flux sanguin associée à une hyper-perméabilité 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 flux sanguin et la vasodilatation chronique des microvaisseaux. Ce stress hémodynamique engendrerait une réponse adaptative de la paroi vasculaire et progressivement un épaissement de la membrane basale. L'épaississement de la membrane basale, associé à l'hypertension, induirait l'altération de la BHR associée à une hyperperméabilité des microvaisseaux (**Dosso *et al.*, 1999**).

➤ Hypothèses biochimiques

a- Voie de polyols

Dans les tissus non insulino-dépendants, tels que le cerveau ou la rétine, l'absorption du glucose est directement proportionnelle à la concentration sanguine en glucose et est donc plus élevée au cours du diabète. Les voies de métabolisme du glucose (la glycolyse et la voie des pentoses phosphates) ne suffisent pas à réduire la concentration intracellulaire accrue en glucose. Le métabolisme du glucose excédentaire est alors pris en charge par la voie des polyols, qui fait intervenir séquentiellement l'aldose réductase et la sorbitol déshydrogénase. L'aldose réductase, activée uniquement en présence de fortes concentrations de glucose, réduit le glucose en sorbitol (Figure 31).

Les conséquences biochimiques de l'activation de cette voie de métabolisme sont une accumulation de sorbitol et de fructose.

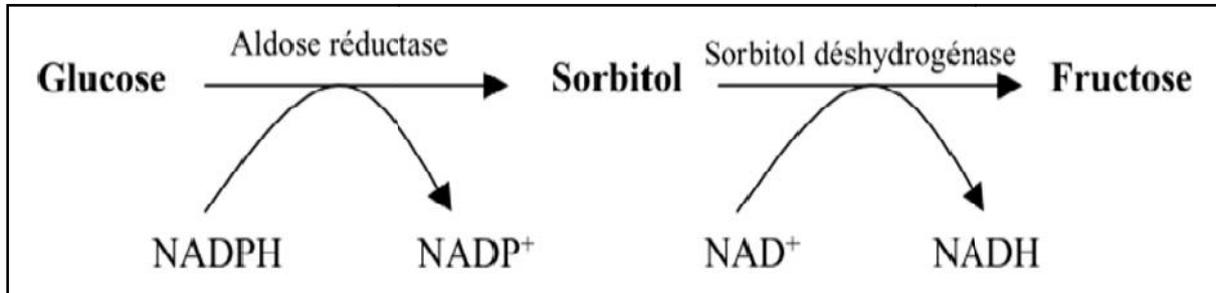


Figure 31: la voie des polyols

b- Voie de la PKC

Un second mécanisme pathogénique proposé dans le développement des complications microvasculaires du diabète est l'activation de protéines kinases C (PKC), résultant de la modification des taux de diacylglycérol (DAG) (**Idris *et al.*, 2001**). Parmi les douze isoformes décrites de PKC, seules trois semblent être activées par les DAG dans la rétine, les PKC- α , β et II (**Koya et King, 1998**), cette dernière serait plus particulièrement impliquée lors du diabète (**Inoguchi *et al.*, 1992**). (Figure 32).

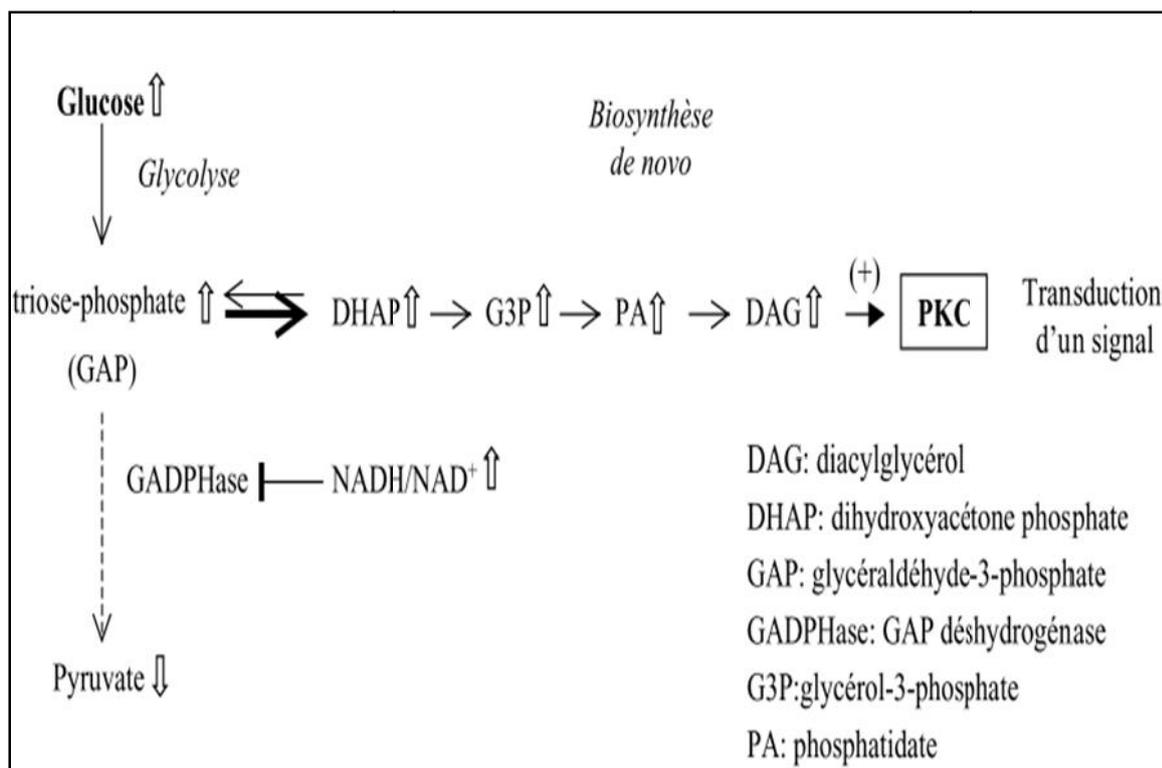


Figure 32: L'activation des PKC

Les conséquences de cette activation dans les complications microvasculaires rétinienne sont multiples. La phospholipase A2 (PLA2) est activée et libère de l'acide arachidonique (AA) et de la prostaglandine E2 (PGE2), ayant pour conséquence l'inhibition de la pompe Na/K ATPase (Kowluru *et al.*, 1998). L'AA libéré pourrait également agir en synergie avec les DAG pour l'activation de PKC (Lu *et al.*, 2000). La phosphorylation de protéines de structure, comme l'actine et la vinculine (Schliwa *et al.*, 1984), et de protéines des jonctions serrées, comme l'occludine et ZO-1 (Antonetti *et al.*, 1999), causerait une réorganisation du cytosquelette, associée à un désassemblage des jonctions intercellulaires aboutissant à une hyper-perméabilité vasculaire des microvaisseaux rétiens. La voie de la PKC participerait également aux dysfonctionnements de l'endothélium rétinien.

c- Voie des hexosamines

L'hyperglycémie génèrerait une augmentation du flux du glucose dans la voie des hexosamines, qui consiste en la conversion du glucose en UDP-N-acétylglucosamine.

L'augmentation de la concentration intracellulaire en glucose induit la formation accrue de fructose-6P qui est alors métabolisé en glucosamine-6P en présence de glutamine, par l'enzyme glucosamine:fructose amidotransférase (GFAT) puis transformé finalement en UDP-N-acétylglucosamine (UDP-GlcNac) (Figure 33) (Schleicher et Weigert, 2000). L'accumulation de l'intermédiaire métabolique, le fructose-6P, résulterait d'une altération de l'activité GAPDHase, par une production mitochondriale de ROS et/ou d'une baisse du rapport NAD⁺/NADH par la voie des polyols. La GFAT, enzyme dont l'activité est limitante dans la voie des hexosamines, est présente dans une variété de types cellulaires, tels que les cellules endothéliales microvasculaires (Wu *et al.*, 2001), les adipocytes, les cellules musculaires squelettiques, les cellules mésangiales et glomérulaires (Nerlich *et al.*, 1998).

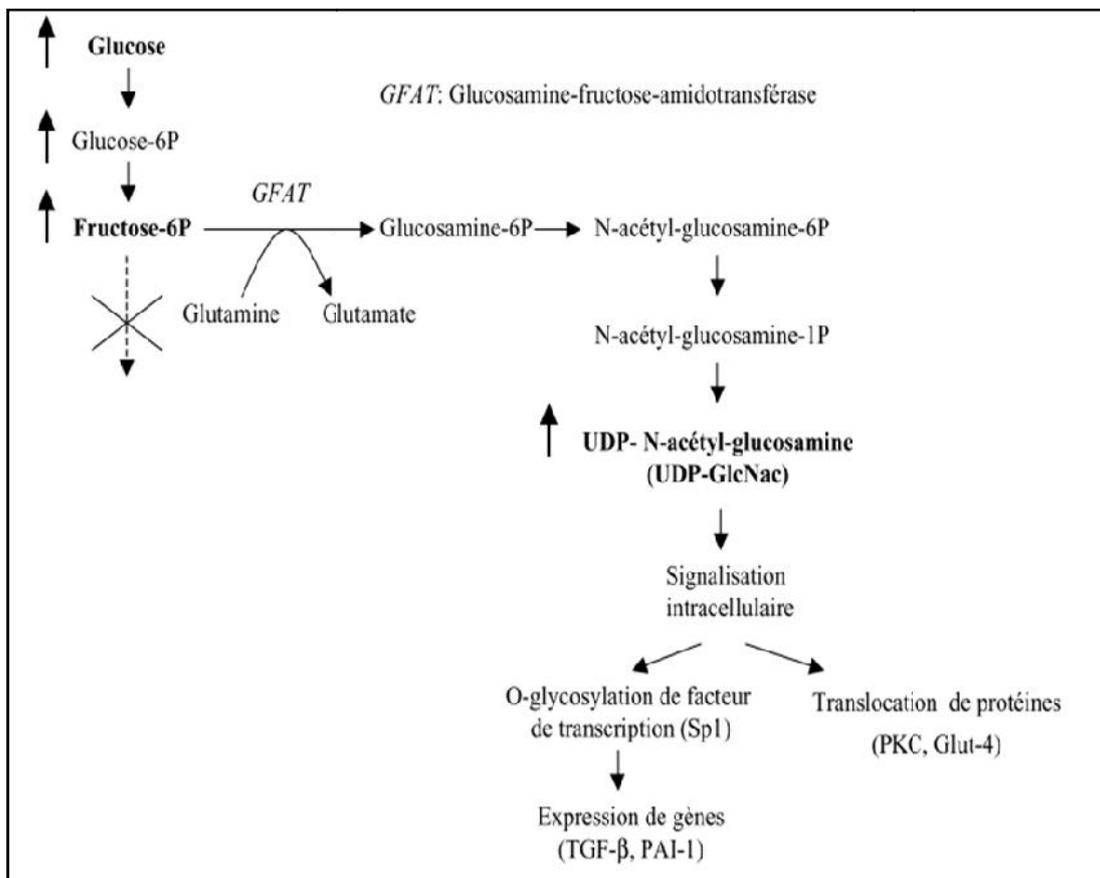


Figure 33: La voie des hexosamines et conséquences.

d- Les AGEs

Un des mécanismes pathogéniques proposé pour expliquer la toxicité vasculaire du glucose, est la formation accrue de produits avancés de glycation, également nommés AGE (Advanced Glycation End-Products) formés par la glycosylation non-enzymatique de protéines (**Baynes *et al.*, 1989**) d'ADN (**Lee et Cerami, 1990**) et de lipides (**Bucala *et al.*, 1993**).

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.

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 leur sérum (**Ono *et al.*, 1998**).

3- Traitement pharmacologique

❖ Voies locales

➤ Les Anti-VEGF

L'une des molécules clés de l'angiogenèse est le «vascular endothelial growth factor» (VEGF), dont la production augmente en réponse à une hypoxie. Sa liaison avec les récepteurs du VEGF localisés sur les cellules endothéliales induit le bourgeonnement de nouveaux vaisseaux par l'intermédiaire d'une activation de la tyrosine kinase et d'une cascade de signaux intracellulaires (**Kaiser, 2006**). Ainsi, l'inhibition du VEGF apparaît comme stratégie possible pour traiter la rétinopathie diabétique et ses complications.

Pour cela, plusieurs stratégies sont envisageables : diminuer sa fabrication, empêcher sa fixation sur leur récepteur ou enfin empêcher la fabrication des récepteurs (**Bhisitkul, 2006**).

Tous les anti-VEGF utilisés actuellement, agissent par le même mécanisme; ils se lient au VEGF circulant dans le sang, inhibant ainsi sa liaison avec son récepteur spécifique. Aboutissant par la suite à une régression des vaisseaux sanguins encore immatures (**Adamis, 2005**).

4- La réaction inflammatoire

L'inflammation est une réponse non spécifique de l'organisme suite à une agression qui engendre une cascade d'évènements biochimiques et la production de plusieurs médiateurs moléculaires (**Kern, 2007**).

L'inflammation a généralement des effets bénéfiques sur une base aiguë, mais peut avoir des effets indésirables si elle devient persistante et vire vers la chronicité. Le modèle de l'inflammation cellulaire classique a été reconnu depuis des décennies, mais les discussions actuelles de l'inflammation comprennent également des changements et des mécanismes moléculaires.

La réponse inflammatoire peut être divisée en deux phases : une phase vasculaire qui comprend la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité vasculaire et une phase cellulaire dans laquelle il y a recrutement et migration des leucocytes au siège de la lésion.

Les facteurs de transcription, tel le facteur de transcription nucléaire kappa B (NF- κ B), jouent un rôle critique dans la réponse chronique puisque leur activation perpétue les processus inflammatoires en augmentant l'expression de plusieurs cytokines incluant la cyclooxygénase-2 (COX-2), l'interleukine-1 beta (IL-1 β) et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) (**Kern, 2007 ; Tang et Kern, 2011**).

Plusieurs changements moléculaires et fonctionnels, caractéristiques de la réponse inflammatoire ont été identifiés dans la rétine chez des patients diabétiques ou des modèles animaux de diabète, suggérant ainsi un rôle pour l'inflammation dans le développement et la progression de la rétinopathie diabétique (**Kern, 2007**).

❖ ANNEXE II

1- Modèle expérimental

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** ».

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%.

➤ **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 saufs 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 déperditions hydriques en produisant une urine très concentrée.

➤ **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.

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.



Camion citerne



Terriers des rongeurs



Inondation des terriers



Capture manuelle



Les rongeurs sont capturés à la sortie des terriers



***Psammomys obesus* est récupéré dans des cages**

Tableau 3 : Les différentes étapes de la chasse du *Psammomys obesus*

➤ Composition des régimes alimentaires

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

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 4: La composition centésimale du régime naturel.

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

Tableau 5: La composition alimentaire pour 100g de ce régime hypercalorique.

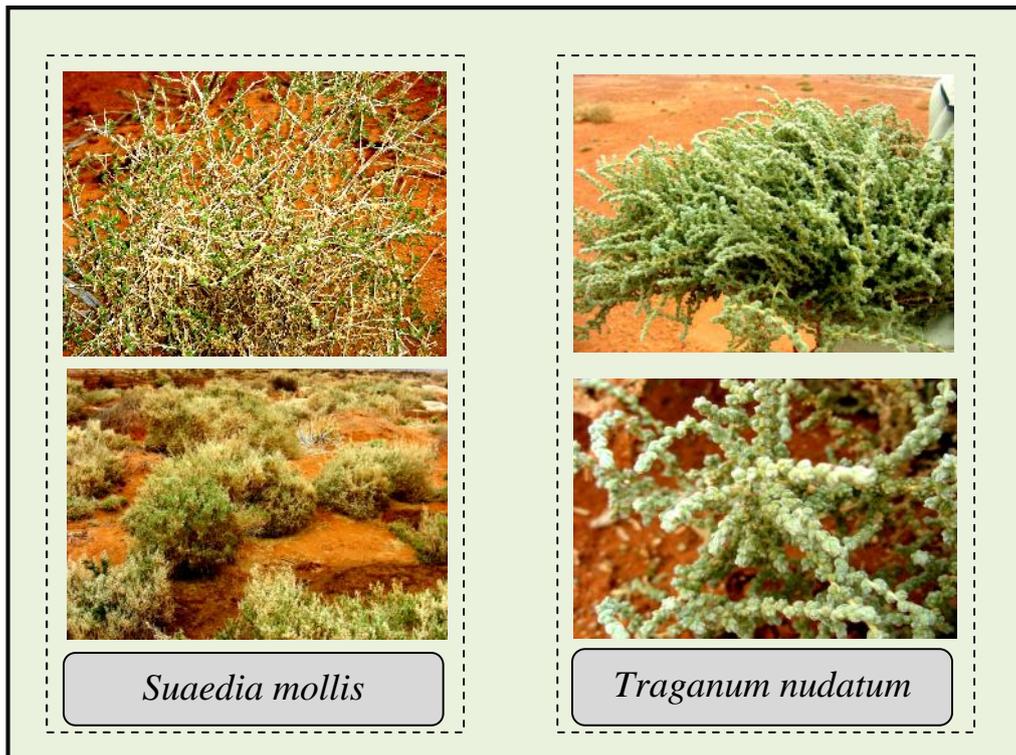


Figure 34 : Biotope des plantes halophile dont se nourrit *Psammomys obesus*.

❖ ANNEXE III

	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****
Moyenne ± ESM	13	97.90± 0.99	208.40± 0.98****

Tableau 6: Evolution pondérale des *psammomys obesus* témoins soumis au RN et les *psammomys obesus* soumis au RHC pendant 13 mois

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

	Glycémie (mg/100ml) de <i>Psammomys</i> soumis au		
	Durée en mois	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****
Moyenne ± ESM	13	74.10± 1.08	210.20± 7.21****

Tableau 7 : Evolution de la glycémie en mg/100ml des *Psammomys obesus* témoins soumis au RN et des *Psammomys obesus* soumis au RHC pendant 13 mois.

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

	Triglycéridémie (mg/100ml) de <i>Psammomys</i> soumis au		
	Durée en mois	RN	RHC
Moyenne ± ESM	0	67.70± 0.85	76.67± 0.95
Moyenne ± ESM	3	64.50± 0.91	197.80± 5.36****
Moyenne ± ESM	6	68.30± 0.99	234.34± 7.15****
Moyenne ± ESM	9	73.80± 0.98	243.53± 6.92****
Moyenne ± ESM	13	74.60± 0.99	249.1± 7.21****

Tableau 8 : Evolution de la triglycéridémie en mg/100ml des *psammomys obesus* témoins soumis au RN et des *psammomys obesus* soumis au RHC pendant 13 mois.

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

	Durée en mois	Cholestérolémie (mg/100ml) de <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****
Moyenne ± ESM	13	58.65± 1.12	142.60± 3.89****

Tableau 9 : Evolution de la cholestérolémie en mg/100ml des *psammomys obesus* témoins soumis au RN et des *psammomys obesus* soumis au RHC pendant 13 mois.

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

	Durée en mois	Insulinémie (mg/100ml) de <i>Psammomyssoumis</i> au	
		RN	RHC
Moyenne ± ESM	0	26.20± 0.48	22.07± 0.42
Moyenne ± ESM	3	24.40± 0.45	265.60± 6.31****
Moyenne ± ESM	6	25.30± 0.38	280.40± 6.13****
Moyenne ± ESM	9	27.50± 0.44	364.07± 7.30****
Moyenne ± ESM	13	27.9± 0.46	368.25± 7.48****

Tableau 10 : Evolution de l'insulinémie en $\mu\text{UI/ml}$ des *psammomys obesus* soumis au RN et des *psammomys obesus* soumis au RHC pendant 13 mois.

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