

L'état diabétique modifie la matrice extracellulaire

Le syndrome diabétique en général, et l'hyperglycémie qui le caractérise en particulier, provoque des modifications structurales et fonctionnelles de la matrice extracellulaire qui sont à l'origine de complications vasculaires et nerveuses de première importance. En outre, le dysfonctionnement endocrine pancréatique peut être relié chez certains modèles animaux expérimentaux à l'installation d'une fibrose, ce qui fournit de précieuses informations sur l'évolution des membranes basales chez le sujet diabétique.

En sus des modifications quantitatives des différents constituants de la matrice extracellulaire, l'hyperglycémie induit des modifications qualitatives par le biais de glycations des constituants de la matrice. Ces réactions se déroulent en 3 étapes :

- liaison de la fonction aldéhyde du glucose avec la lysine ou la fonction amine N-terminale d'une protéine. D'autres résidus aminés protéiques peuvent être concernés. Il se forme ainsi transitoirement une base de Schiff
- transformation de la base de Schiff en un produit d'Amadori (l'hémoglobine glycosylée ou la fructose-lysine provenant du collagène cutané en sont des exemples). Cette réaction est quasi irréversible puisque la constante de dissociation représente moins de 2 % de celle de synthèse.
- formation lente et irréversible, par le biais d'intermédiaires tels les déoxyglucosones, de produits de Maillard (encore appelés produits terminaux de glycation ou PTEG) fluorescents au niveau de protéines structurales à longue durée de vie. Des liaisons croisées entre molécules s'établissent, créant ainsi une réticulation de celles-ci. Il se forme des composés kéto-imine qui brunissent en produisant des radicaux oxygénés. Des fragmentations protéiques peuvent en résulter, qui se produisent au niveau de résidus histidine ou lysine, perturbant ainsi la fixation de métaux de transition, cofacteurs de nombreuses enzymes.

Ces glycations sont en fait les prémices de véritables gluco-oxydations aboutissant à l'élaboration de produits tels que la carboxy-méthyl-lysine, la carboxy-méthyl-hydroxy-lysine qui proviennent de l'oxydation de composés d'Amadori, le méthylglyoxal, la dihydroxy-lysinonorleucine (DHLNL), la fructose-hydroxy-lysine ou la pentosidine qui se forme à partir d'une réaction d'auto-oxydation entre des résidus arginine et lysine.

Ces modifications biochimiques conduisent à un durcissement de la matrice extracellulaire ainsi qu'à l'altération de ses propriétés de fixation d'enzymes ou de cofacteurs, ce qui modifie également son rôle d'inducteur de différenciation et de transmission de signaux vers les cellules qui y sont adhérentes. Il faut cependant remarquer que ces changements présentent une forte hétérogénéité tissulaire, ne concernant que certains types de cellules (endothéliales en particulier), ce qui peut être relié à la grande variabilité intercellulaire quant aux réponses à un environnement hyperglycémique.

LES MECANISMES DE REMODELAGE DE LA MATRICE PRESENTENT DE GRANDES VARIABILITES INDIVIDUELLES

Chez l'animal, on a pu montrer que de nombreux types cellulaires (macrophages, fibroblastes, cellules musculaires lisses, endothéliales et mésangiales) possèdent **un récepteur aux produits terminaux de glycation**. Sa stimulation provoque la production d'IGF 1 et de PDGF ainsi que des cytokines telles que le TNF ou l'IL1. Ces molécules mobilisent les cellules endothéliales et mésenchymateuses pour sécréter de la collagénase et d'autres protéases qui remodelent la structure de la lame basale: production de collagène de type IV au niveau mésangial, catabolisme des protéoglycannes, augmentation de la perméabilité vasculaire et altération du tonus vasculaire par l'inactivation de l'EDRF (Endothelial Derived Relaxin Factor). L'activité de ce récepteur est stimulée par le TNF mais inhibée par l'insuline. Cependant, la distribution de ce récepteur ainsi que l'efficacité de sa stimulation présentent une grande variation entre les différentes espèces et les différents individus. C'est peut être une des causes des différences constatées chez l'être humain dans l'ampleur et la gravité des différentes atteintes de la matrice extracellulaire causées par le diabète NID.

LA MATRICE EXTRACELLULAIRE, UNE STRUCTURE DYNAMIQUE DE GUIDAGE, D'ECHANGE ET DE DIFFERENCIATION POUR LES CELLULES DE L'ORGANISME.

Pendant de nombreuses années, la matrice extracellulaire a été considérée comme une structure de soutien passif des cellules. Ces 20 dernières années, son implication dans diverses pathologies, dont le diabète, et son étude fondamentale ont permis de dégager ses rôles primordiaux dans les processus de guidage et de différenciation des cellules, ainsi que son implication dans les échanges entre l'organisme et son milieu. Ainsi, **la matrice joue un rôle actif et complexe dans la régulation du comportement des cellules qui sont à son contact**, influant sur leur développement, leur migration, leur prolifération, leur forme et leurs fonctions métaboliques.

La matrice extracellulaire est constituée d'un ensemble de polysaccharides et de protéines sécrétées localement par plusieurs types cellulaires et qui s'assemblent en un réseau organisé autour des cellules dans les tissus conjonctifs. Les principales classes de macromolécules qui composent cette matrice sont:

- les polysaccharides glycosaminoglycannes reliés de façon covalente à une protéine pour former des **protéoglycannes**. Ces molécules, comme par exemple le **perlecan**, constituent une "substance fondamentale" très hydratée, ressemblant à un gel et jouant un rôle dans l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaire.
- les protéines fibreuses de deux types fonctionnels: structurales (**collagènes** et **élastine**) et adhésives (**fibronectines** et **laminines**).
- des molécules riches en cystéine comme le **SPARC** (secreted protein acidic and rich in cysteine) ou les **fibulines** qui sont capables de fixer du calcium pour interagir avec des récepteurs cellulaires au cours du développement (SPARC) ou pour stabiliser les réseaux de collagène et de laminine (fibulines).

• Parmi les macromolécules présentes dans la matrice, la **fibronectine** apparaît comme le connecteur multifonctionnel le mieux connu, capable de relier les intégrines transmembranaires des cellules et le collagène extracellulaire. De plus, c'est un site facile de reconnaissance, jouant un rôle de piège pour les facteurs de croissance comme le TGF β au niveau hépatique. Elle influe sur la forme des cellules et sur leur mobilité. Elle joue un rôle dynamique dans les organisations pluricellulaires, c'est-à-dire dans la migration par l'intermédiaire de leurs domaines d'ancrage, et dans l'orientation (rôle signalé au niveau des neurones). La fibronectine intervient également sur la prolifération et la différenciation notamment chez l'embryon. Pour que la prolifération soit assurée, la cellule doit être mobile et isolée. Ce sont les intégrines qui, par le biais d'un complexe d'adhérence intracellulaire, lient le cytosquelette à la matrice et provoquent l'émission de signaux intracellulaires par des mécanismes analogues à ceux produits par la fixation d'une hormone sur son récepteur.

La complexité fonctionnelle de la fibronectine se reflète dans sa structure moléculaire. En effet, la fibronectine est un dimère composé de deux sous-unités identiques, chacune ayant une longueur de près de 2500 résidus d'acides aminés, reliées par une paire de ponts disulfure près de leurs extrémités carboxylées et repliées en une série de domaines globulaires. Cette glycoprotéine existe sous trois formes:

- soluble nommée *fibronectine plasmique* circulant dans le sang et d'autres fluides corporels
- attachée de façon transitoire à la surface des cellules nommée *fibronectine de surface cellulaire*
- insoluble fibrillaire formée dans la matrice extracellulaire nommée *fibronectine matricielle*.

Les différents domaines globulaires jouent des rôles variés. Le domaine responsable de l'activité de liaison à la cellule a été isolé à partir de fragments protéolytiques et la séquence tripeptidique particulière Arg - Gly - Asp ou RGD a été caractérisée. Les peptides contenant cette séquence RGD sont en compétition pour le site de liaison sur les cellules et inhibent ainsi l'attachement des cellules à la fibronectine. Lorsque ces peptides sont couplés à une surface solide, ils provoquent l'adhérence des cellules à cette surface.

• La **laminine** est une glycoprotéine localisée au niveau de la membrane basale entre le collagène de type IV et les cellules épithéliales, facilitant leur fixation à cette lame basale qui joue un rôle fondamental dans la régénération et la prolifération cellulaires. Elle est composée de trois domaines fonctionnels: l'un d'eux se lie au collagène de type IV, un autre à l'héparane sulfate perlecan et un (ou plusieurs autres) aux récepteurs protéiques spécifiques à la surface des cellules nommés globalement intégrines. Selon ces complexes, on distingue une dizaine de types de laminines dont la répartition varie selon les tissus considérés. Chez l'embryon, la laminine 1 induit la différenciation des cellules B pancréatiques. Les laminines sont de gros complexes (~ 850 KDa) composés de trois très longues chaînes polypeptidiques, et (chacune possédant plus de 1500 résidus d'acides aminés) disposées en forme de croix et unies par des ponts disulfure. Au voisinage de l'intersection des branches de la croix, sur le domaine, se place une molécule d'**entactine** (encore appelé **nidogène**) appartenant à la famille des glycoprotéines d'ancrage. L'**entactine** joue le rôle d'un **connecteur multifonctionnel** capable de relier laminine, collagène de type IV, fibuline et perlecan. Il

stabilise donc la structure tridimensionnelle moléculaire de la matrice extracellulaire. Avec l'intervention du calcium, la laminine 1 forme un polymère à maille hexagonale.

- Les **collagènes** constituent une trame tri-dimensionnelle où viennent s'ancrer les fibronectines.

“Le” collagène, une des protéines la plus abondante de l'organisme, est formé par un ensemble de fibres lisses de taille variable souvent associées aux fibres élastiques parmi les protéoglycannes et les glycoprotéines de structure. La microscopie électronique permet de préciser l'ultrastructure de ces fibres. Elles sont formées par l'alignement bout à bout de milliers de tropocollagène qui est l'unité de base du collagène, avec un décalage de 640 Å d'où la striation transversale observée sur les fibres. Le tropocollagène, d'un poids moléculaire d'environ 350 000, est constitué par trois chaînes polypeptidiques, de même taille, torsadées en hélice dont deux sont identiques: les chaînes α_1 et α_2 . Ces dernières contiennent environ 1050 acides aminés ce qui fait du tropocollagène un des plus longs peptides connus. La molécule de collagène a une forte teneur en glycine, proline, hydroxyproline et alanine et ne contient ni cystéine, ni tryptophane. La cohésion entre acides aminés est assurée par des liaisons hydrogènes et des liaisons covalentes. Des disaccharides (galactose et glucose) se fixent sur l'hydroxylysine ou la lysine.

On distingue plusieurs types de collagène :

- les collagènes interstitiels (types I, II et III), de structure fibrillaire, responsables de la cohésion, de la rigidité et de la résistance mécanique de l'organisme, produits essentiellement par les fibroblastes.
- les collagènes des lames basales (type IV), synthétisés par les cellules adjacentes telles que les cellules épithéliales, les **cellules endothéliales vasculaires**, les kératinocytes, les myocytes, les adipocytes et les **cellules de Schwann**. Outre son rôle mécanique, certains de ses domaines peuvent agir sur le métabolisme cellulaire: il en est ainsi pour le domaine NC1 qui possède une action inhibitrice sur l'angiogénèse.
- les collagènes de types V à XIII sont non fibrillaires, situés dans les tissus interstitiels, l'endothélium vasculaire, le cartilage, les tendons, les ligaments et l'oeil.

La biosynthèse du collagène fibrillaire s'effectue dans les fibroblastes en 7 étapes :

- 1 - Transcription en ARNm à partir du génome pour donner les chaînes pro α_1 et α_2 .
- 2 - Traduction des ARNm par les ribosomes puis passage dans le reticulum endoplasmique.
- 3 - Assemblage des chaînes pro α_1 et α_2 . Les extrémités globulaires s'associent l'une à l'autre pour former la triple hélice.
- 4 - Hydroxylation de certains acides aminés: proline et lysine.
- 5 - Glycosylation du procollagène dans l'appareil de Golgi, puis exportation de ce procollagène dans les vésicules de sécrétion vers l'extérieur du fibroblaste.
- 6 - Excision du procollagène : formation du tropocollagène insoluble.
- 7 - Polymérisation des fibrilles.

Le catabolisme du collagène est assuré par des enzymes collagénolytiques telles que la collagénase (dans les polynucléaires et les macrophages), l'élastase et la cathepsine G (dans les leucocytes), les protéinases telles que les cathepsines B et D (dans les

lysosomes). En clinique, ce catabolisme est apprécié par la mesure de l'hydroxyprolinurie (taux normal = 50 à 100 mg/24 heures).

Le renouvellement du collagène s'effectue essentiellement dans le foie (demi-vie = 30 jours) et dans le muscle (demi-vie = 60 jours).

La synthèse du collagène de type IV débute par la transcription en ARNm du gène porté par le chromosome 13 des cellules épithéliales. Après maturation, l'ARNm est traduit en une séquence d'acides aminés, principalement en enchaînement de triplets "glycine-X-Y" (X= protéine, Y= hydroxyproline ou hydroxylysine sur laquelle sont fixés des résidus glycosyls, le plus souvent glucose-galactose, caractéristique du collagène). Par la suite, cette chaîne s'établit en conformation d'hélice. Après alignement, trois hélices s'associent de l'extrémité globulaire C-terminale (NC1) vers l'extrémité N-terminale pour donner une superhélice dextre formant la molécule de collagène de type IV. Le transport intracellulaire de ce collagène serait assuré par une phosphoprotéine. Plus de 60 % des prolines de la molécule sont alors hydroxylées en hydroxyproline. Lors de la sécrétion, à partir de vacuoles d'exocytose, s'effectue au niveau de la matrice péricellulaire la formation des différents types de liaisons covalentes croisées intra et intermoléculaires selon deux étapes: tout d'abord une désamination oxydative puis des processus physiologiques de maturation et de vieillissement qui ont pour conséquence de rigidifier le collagène et de le rendre totalement insoluble.

Le collagène de type IV confère un rôle important aux membranes basales qui se trouvent à la base de toutes les structures épithéliales. En effet, puisqu'elles assurent l'interface entre les cellules du tissu et la matrice extracellulaire environnante, on peut leur attribuer les fonctions suivantes :

- maintien de l'architecture des tissus
- compartimentalisation
- support et contrôle de l'adhésion cellulaire
- émission ou transmission de diverses informations aux cellules
- membranes semi-capillaires bloquant le passage des protéines vers les compartiments extravasculaires
- réception et intégration des signaux qui aboutissent à une expression spécifique des gènes dans les tissus différenciés
- induction de la différenciation cellulaire
- guide pour la migration cellulaire, notamment dans la morphogenèse.
- réservoir de facteurs de croissance

L'ensemble des molécules de la matrice extracellulaire s'organise sous la forme d'un **double réseau tridimensionnel**, un réseau de collagène IV étant relié via du nidogène 1 à un réseau de laminine 1. On obtient ainsi un réseau comportant un enchevêtrement de polygones. Le collagène y forme des hélices supramoléculaires grâce à de nombreuses associations latérales entre les brins de ses tétramères.

MODIFICATIONS DE LA MEMBRANE BASALE

Ces changements sont surtout étudiés au niveau de la lame basale des capillaires sanguins. Cependant, ils existent également dans les phénomènes de fibrose pancréatique. Tirant leur origine de l'hyperglycémie, ils sont également impliqués dans les mécanismes aboutissant à des malformations chez les enfants de mères diabétiques.

Photo a

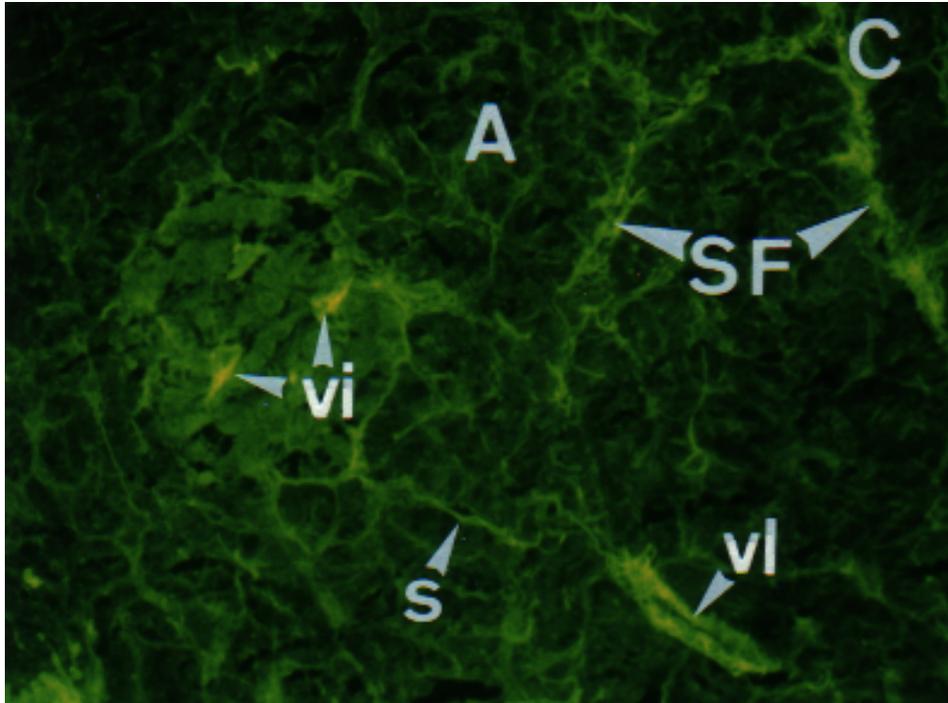
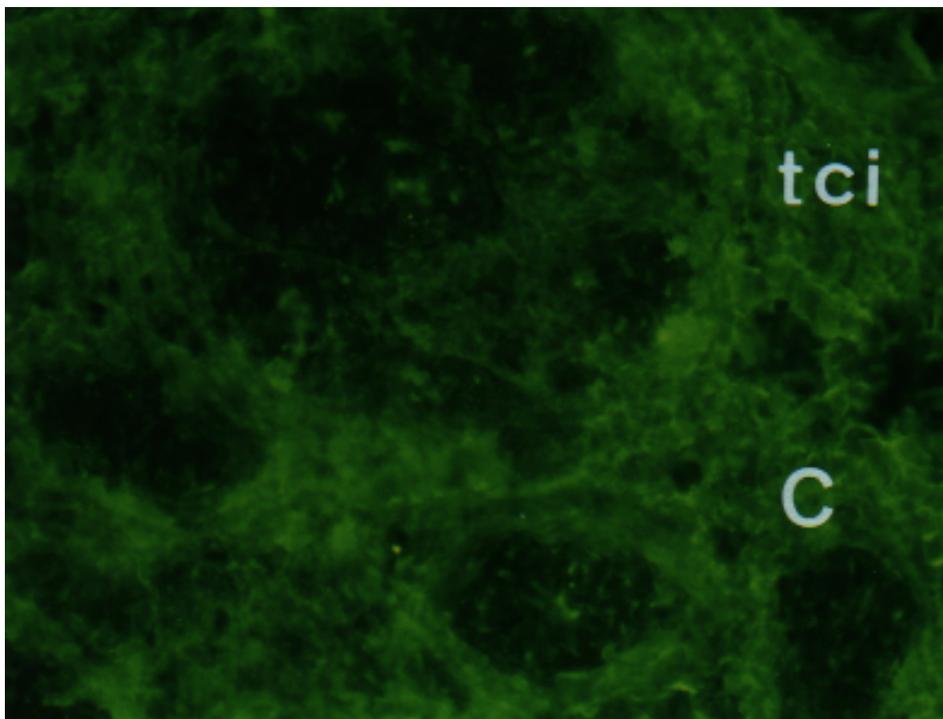


Photo b



Marquage par immunofluorescence du collagène de type I dans le pancréas:

a - individu sain: l'immunofluorescence du collagène (**C**) est nette au niveau de septum fibreux (**SF**), de petits septa (**s**) dans le parenchyme exocrine et au niveau de vaisseaux centrolobulaires (**vl**) et centro insulaires (**vi**). Le pourtour des acini (**A**) est légèrement souligné. (x 250).

b - individu diabétique: collagène (**C**) d'aspect fibreux, bien marqué dans le tissu conjonctif interstitiel (**tci**). (x 400).

Photo a

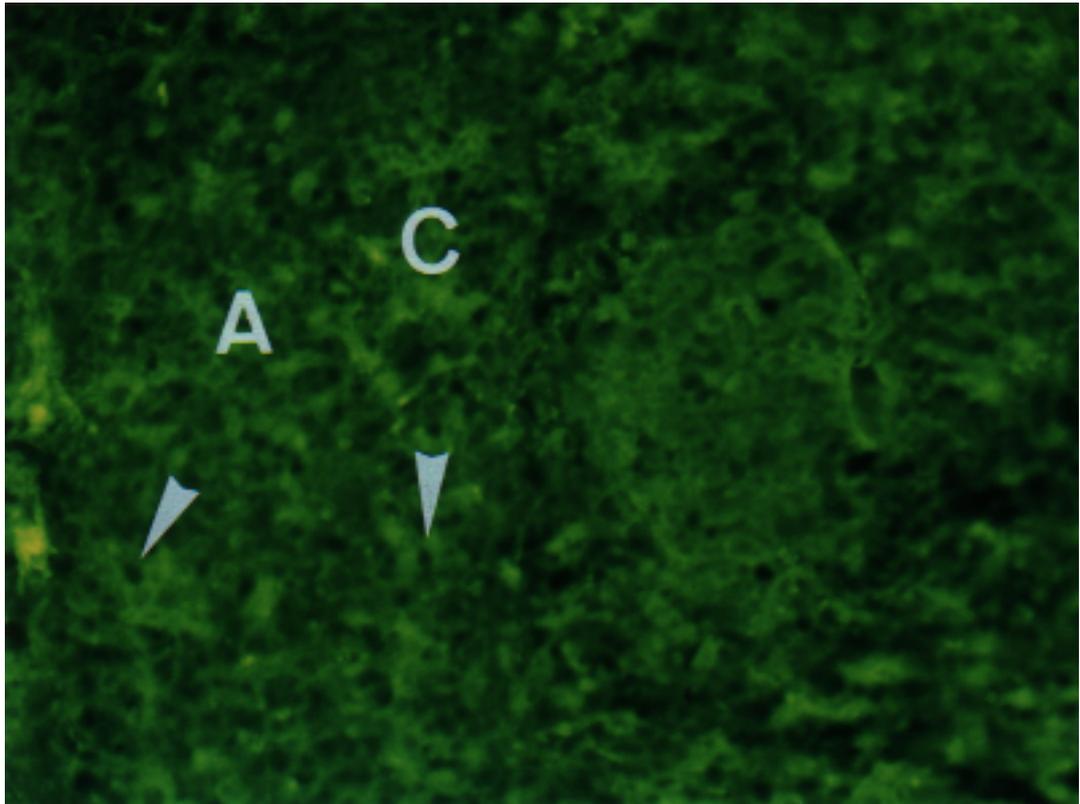
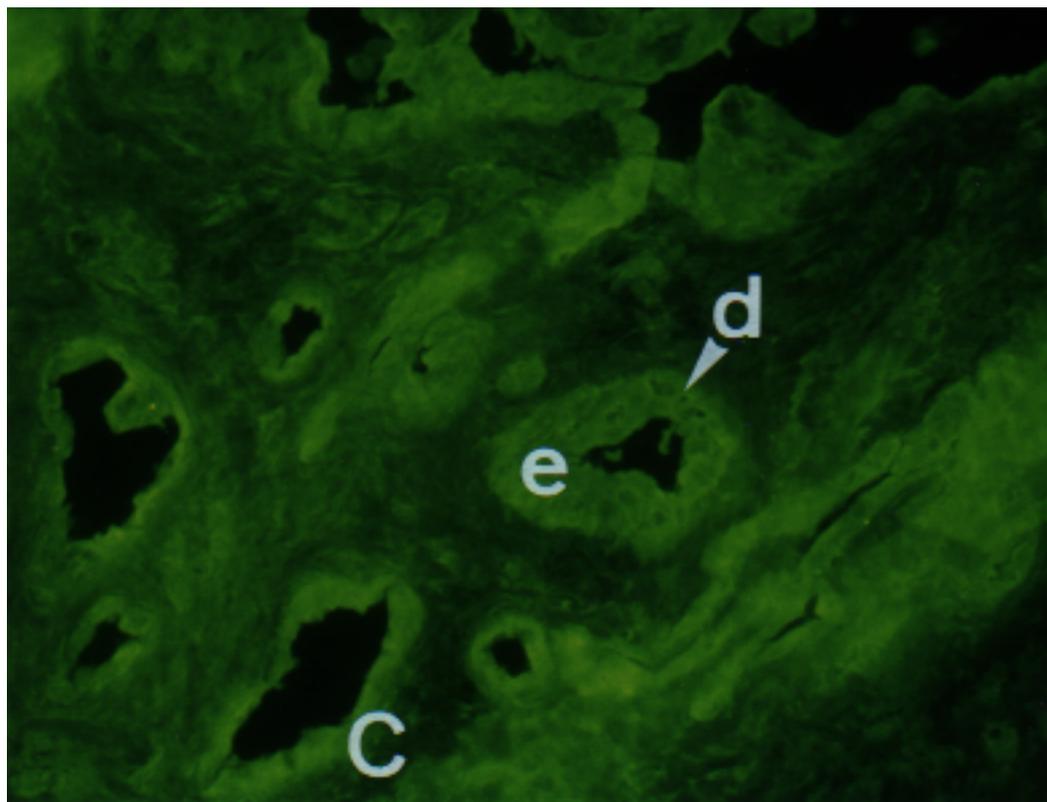


Photo b



Marquage par immunofluorescence du collagène de type III dans le pancréas:

a - individu sain: aspect punctiforme de l'immunofluorescence du collagène (C) marquant les cellules acineuses (A) côté lumière. (x 250).

b - individu diabétique: seuls les épithéliums (e) de ductules (d) montrent une immunofluorescence diffuse dans un tissu conjonctif interstitiel (tci) faiblement marqué. (x 250).

LE GLUCOSE INDUIT RAPIDEMENT ET DURABLEMENT UNE SUREXPRESSION DES MOLECULES DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE

Des études ont montré *in vitro* qu'une hyperglycémie, même transitoire, provoquait une synthèse accrue des collagène de types IV et I (au niveau glomérulaire pour ce dernier) ainsi que de la laminine et de la fibronectine. Au niveau rétinien, la synthèse du PAI-1 est augmentée alors que la production des protéoglycannes héparane sulfate glomérulaires est diminuée du fait de la réduction de l'activité de l'enzyme N-acétyl-heparane- déacétylase.

L'origine du message modifiant l'expression de ces différents gènes pourrait être la membrane basale elle même: la glycation de ses composantes, comme le collagène, la laminine ou les intégrines peut être à l'origine d'un signal intracellulaire modifiant l'expression des gènes de ses propres constituants. L'utilisation expérimentale de constituants glyqués de la matrice a montré une action favorisant ou inhibant la prolifération de types cellulaires impliqués dans les désordres rétiniens ou vasculaires caractérisant le diabète de type 2. Ainsi, la prolifération des cellules endothéliales est diminuée *in vitro* par des modifications du cytosquelette d'actine induites par l'épaississement de la matrice extracellulaire, qui est à l'origine d'une plus forte adhésion des cellules à celle ci.

Il est important de noter que cette surexpression génétique des constituants de la matrice extracellulaire semble **acquise** même si l'hyperglycémie qui en est à l'origine n'est que transitoire: elle persiste même après plusieurs divisions cellulaires. Ainsi, le retour à une glycémie normale ne diminue que l'expression des gènes du PAI-1, les autres gènes activés par le glucose (ou le galactose) restants surexprimés. Ceci peut contribuer à expliquer **l'irréversibilité des lésions de la matrice extracellulaire**, même après normalisation de la glycémie. Cet effet glucotoxique se manifeste après seulement 10 jours d'exposition hyperglycémique, mais ne concerne que 70 % des cultures cellulaires utilisées: il existe de larges variations individuelles dans la réponse des cellules endothéliales au glucose qui provoque également une synthèse accrue de l'activateur du plasminogène tissulaire (tPA) et de son inhibiteur (PAI-1). Bien que l'action du TGF ait été suspectée dans les réactions cellulaires à l'hyperglycémie, sa sécrétion par les cellules endothéliales n'est pas modifiée dans un milieu hyperglucosé *in vitro*. Les effets inhibiteurs du TGF et du glucose sur la croissance cellulaire montrent que leur action s'exerce selon des voies intracellulaires différentes.

COLLAGENE DE TYPE IV ET FIBRONECTINE SONT SUREXPRIMÉS

Outre l'activation gluco-dépendante de ses gènes, l'hyperproduction de collagène de type IV peut également être reliée à l'activation de la voie des polyols dans les cellules mésangiales. L'oxydation des résidus lysine et hydroxylysine du collagène par la lysine oxydase aboutit à une **réticulation du collagène**. Ceci provoque une augmentation de la distance intermoléculaire, et augmente donc la perméabilité de la membrane basale. Le collagène obtenu est résistant à la protéolyse, et l'expression de la collagénase interstitielle et de type IV n'est pas augmentée. De plus, la composition de la séquence du collagène peut être modifiée par les produits terminaux de glycation: le méthylglyoxal réagit ainsi avec les résidus arginine du collagène de type IV pour former des composés imidazolone. Ces composés perturbent les échanges matrice-cellule car ils se forment au niveau de la séquence

RGD et diminuent fortement l'adhésion cellulaire à la lame basale en agissant sur les intégrines.

Photo a

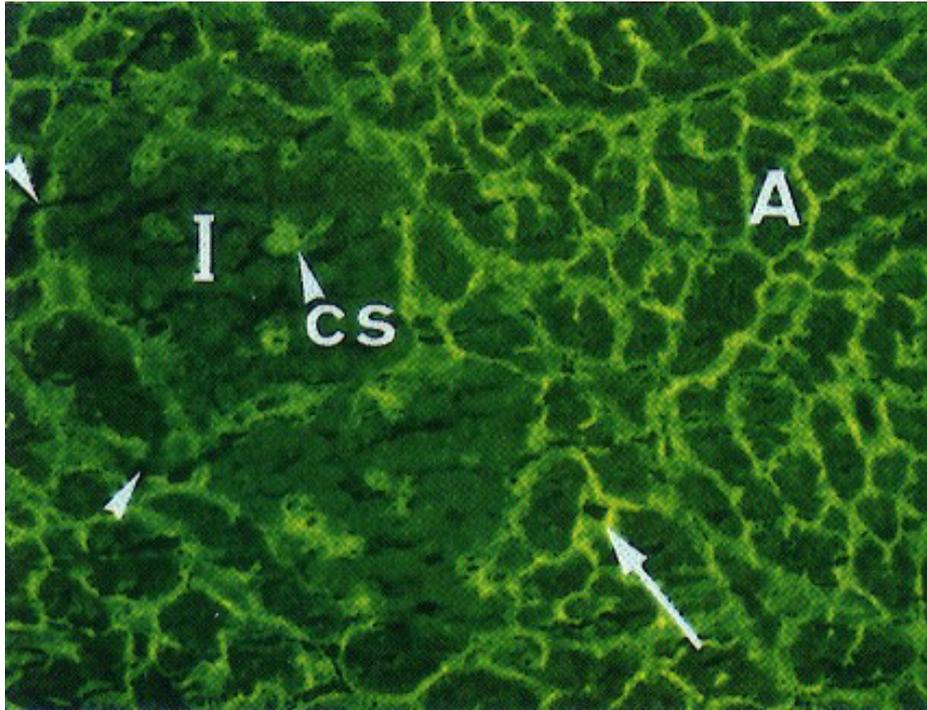
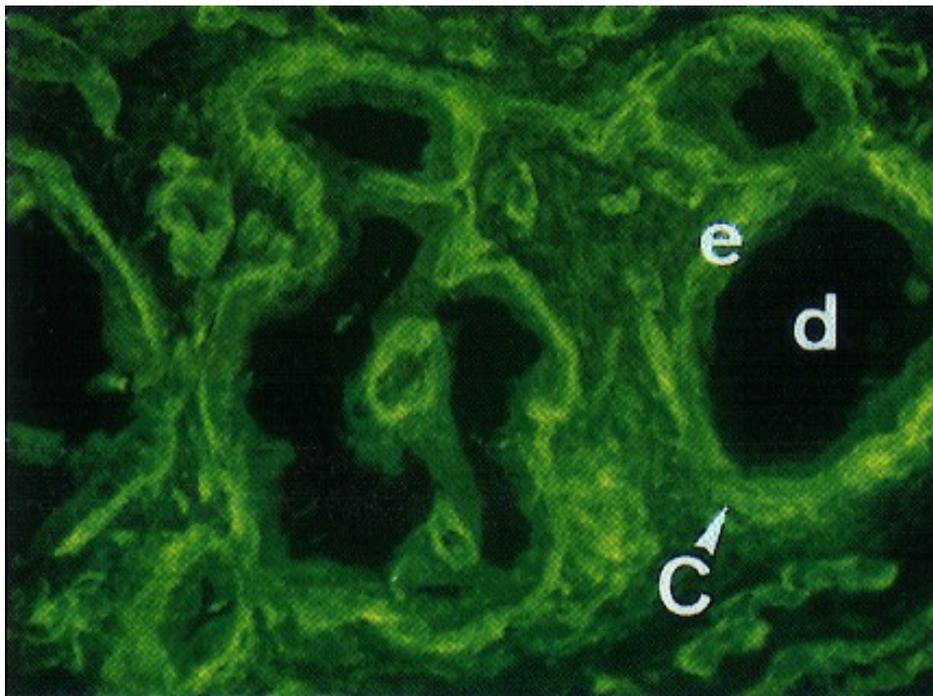


Photo b



Marquage par immunofluorescence du collagène de type IV (même observation avec la laminine) dans le pancréas:

a - individu sain: immunofluorescence du collagène (C) sous forme d'une ligne continue à la base des acini (A), dans l'espace intercellulaire (-->) et autour des capillaires sanguins (cs) et de manière discontinue autour d'un îlot de Langerhans (I). (x 250).

b - individu diabétique: exemple d'une lame épithéliale (e) de collagène (C), très immunofluorescente, à aspect feuilleté resserrant de grands ductules (d) en structures plus petites. Noter l'immunofluorescence dans la matrice interstitielle. (x 1000).

La synthèse de fibronectines est également fortement augmentée (175%) ainsi que celle de la laminine B1. La transcription des gènes du collagène et de la fibronectine est stimulée par le glucose qui se révèle bien ainsi à l'origine de l'enrichissement de la matrice extracellulaire. Cependant, il n'agit pas au niveau de protéines kinases A ou C et des phénomènes de glycosylation non enzymatiques pourraient être à l'origine de cette activation génétique.

LA MEMBRANE BASALE MODIFIEE DEVIENT UN SITE DE FIXATION POUR DES MOLECULES VARIEES

La glycation des protéines génère des groupements réactifs qui peuvent alors se lier de façon covalente à plusieurs protéines plasmatiques: immunoglobulines G, facteur du complément et albumine dans les membranes basales et LDL au niveau des parois artérielles. De plus, ces modifications et ces dépôts peuvent masquer des sites de fixation des protéoglycannes, ce qui, au niveau rénal, diminue la charge négative des glomérules et accroît la perméabilité de ceux-ci.

L'adhérence des cellules endothéliales est diminuée sur une matrice glyquée et elles sont alors susceptibles de découvrir plus largement la membrane basale sous-jacente, ce qui augmente la perméabilité des capillaires.

Ces différentes modifications structurales et fonctionnelles de la matrice extracellulaire (cf. schéma récapitulatif page suivante) sont fortement impliquées dans les complications vasculaires, rénales et nerveuse du diabète NID. Compte tenu du rôle prépondérant de la matrice dans les phénomènes d'oncogenèse, d'angiogenèse et lors du développement, l'étude fondamentale des modifications induites par le diabète NID ouvre une fenêtre d'accès à l'étude du fonctionnement de la matrice dans des phénomènes aussi importants que la formation et la dissémination de tumeurs ou la différenciation cellulaire. Il faut également noter que ces modifications peuvent être particulièrement étudiées dans les phénomènes de fibroses qui accompagnent parfois l'état diabétique, en particulier chez certains modèles animaux (lapin) qui justifient ainsi une fois de plus leur étude.

