

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**GLYCATION NON ENZYMATIQUE DES PROTÉINES ENDOTHÉLIALES
AU COURS DU DIABÈTE**

par

Teodora Avram Mihalache

Département de Pathologie et biologie cellulaire

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)
en biologie cellulaire

©Teodora Avram Mihalache, Août, 2007



Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**GLYCATION NON ENZYMATIQUE DES PROTÉINES ENDOTHÉLIALES
AU COURS DU DIABÈTE**

Présenté par:

Teodora Avram Mihalache

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Docteur Moïse Bendayan.....Président-rapporteur

Docteur Jacques Paiement.....Membre du jury

Docteur Lucian D. Ghitescu..... Directeur de recherche

RÉSUMÉ

La glycation des protéines intracellulaires représente un mécanisme possible de la pathologie cardiovasculaire associée au diabète. Cette hypothèse considère que l'attachement covalent, post-traductionnel, du glucose aux résidus aminés des protéines (principalement lysine) induit une altération de la structure et de la fonction de certaines protéines clés du métabolisme ou de la signalisation cellulaire. La cellule endothéliale possède des transporteurs du glucose dont l'activité n'est pas modulée par l'insuline; l'hyperglycémie diabétique conduira à une augmentation de la concentration intra endothéliale de glucose et accélèra donc le processus de glycation intracellulaire.

Le but du projet est d'identifier les protéines des cellules endothéliales ciblées par la glycation, dans un modèle de diabète expérimental induit chez le rat par la streptozotocine. L'outil principal est un anticorps capable de reconnaître spécifiquement, par immunobuvardage, le produit de condensation non enzymatique glucose-lysine. Nous avons trouvé que le poumon, le tissu le plus vascularisé, représente, à l'exception des globules rouges, l'organe où le processus de glycation se déroule avec une intensité maximale.

Une méthode de purification des cellules endothéliales, utilisant des anticorps contre l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) attachés aux particules magnétiques de 4 μm à été mise au point. Le caractère endothélial des cellules ainsi purifiées a été validé par

immunofluorescence avec des anticorps anti CD34 (un antigène pan endothélial) et par immunobuvardage avec anti-ACE. Le niveau de glycation des protéines endothéliales est deux fois plus élevé que celui détecté dans l'homogénat total de poumon, ce qui témoigne du fait que l'endothélium représente une cible préférentielle pour le processus de glycation. La séparation des protéines endothéliales par électrophorèse bidimensionnelle et l'immunobuvardage avec des anticorps anti-glucitollysine nous a permis de détecter plusieurs spots, intensément glyqués. Les plus abondantes de ces protéines ont été identifiées par spectrométrie de masse.

MOTS CLÉS: diabète, endothélium, poumon, glycation, produits de glycation précoce et avancée

ABSTRACT

The glycation of intracellular proteins represents a possible mechanism in the cardiovascular pathology associated the diabetes. This hypothesis considers that the post transductional, covalent attachment of glucose to the amino residues of the proteins (mainly lysine) induces a structural and functional alteration of certain key proteins of the metabolism or/and cellular signalling. The endothelial glucose transporters are not modulated by insulin; the diabetic hyperglycaemia leads to an increase in the intra-endothelial concentrations of glucose and thus accelerates the process of intracellular glycation.

The objective of this project is to identify endothelial cells proteins targeted by glycation, in a model of experimental diabetes induced, in the rat, by streptozotocin. The principal tool is an antibody able to specifically recognize, by immunoblotting, the product of noenzymatic condensation between glucose- lysine. We found that the lung, the most vascularized tissue, represents, except for the red blood cells, the organ where the process of glycation proceeds with a maximum intensity.

A method of purification of the endothelial cells, using antibodies against the angiotensin conversion enzyme (ACE) attached to magnetic micro particles was developed. The endothelial character of the cells thus purified was validated by immunofluorescence with antibodies anti CD34 (a pan endothelial antigen) and by immunoblotting with anti

ACE. The level of glycation of the endothelial proteins is twice higher than that detected in the total homogenate of lung, which testifies the fact that the endothelium represents a preferential target for the process of glycation. The separation of endothelial proteins by two-dimensional electrophoresis and the immunoblotting with anti-glucitolysine antibodies enabled us to detect several intensely glycated spots. The most abundant of these proteins were identified by mass spectrometry.

KEY WORDS: diabetes, endothelium, lung, early glycation, glycation end products.

TABLE DES MATIÈRES

PAGE TITRE	i
IDENTIFICATION DU JURY	ii
RÉSUMÉ.....	iii
ABSTRACT	v
TABLE DES MATIÈRES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	xvii
DÉDICACE.....	xxii
REMERCIEMENTS.....	xxiii
INTRODUCTION.....	1
A. LE DIABÈTE SUCRÉ ET SES COMPLICATIONS.....	1

A.1. Le diabète	1
A.1.1. Le diabète insulino-dépendant.....	2
A.1.2. Le diabète non insulino-dépendant.....	3
A.2. Les complications vasculaires liées au diabète	4
A.2.1. Les complications macrovasculaires.....	5
A.2.2. Les complications microvasculaires.....	6
A.2.2.1 La rétinopathie	6
A.2.2.2 La néphropathie.....	6
A.2.2.3. La neuropathie	7
B. LES MECANISMES DE L’EFFET TOXIQUE DU GLUCOSE	9
B.1. La voie métabolique des polyols	10
B.2. L’activation de la protéine kinase C	13
B.3. Le stress oxydatif	14
B.4. La glycation des protéines	15
B.4.1. L’origine des produits de glycation.....	15
B.4.2. Les produits terminaux, avancés de glycation (PTAG).....	18

C. LA BIOLOGIE ET LA MORPHOLOGIE DE LA CELLULE	
ENDOTHÉLIALE.....	21
C.1. L'origine de la cellule endothéliale.....	22
C.2. Les fonctions de la cellule endothéliale.....	23
C.2.1. Le rôle de l'endothélium dans la perméabilité vasculaire.....	23
C.2.2. Le rôle de l'endothélium dans le recrutement des leucocytes.....	30
C.2.3. La cellule endothéliale et le tonus vasculaire.....	32
C.2.3.1. Les facteurs de vasodilatation.....	33
C.2.3.2. Les facteurs de vasoconstriction.....	34
C.2.4. La cellule endothéliale et la coagulation.....	35
C.2.4.1. L'activité anticoagulante.....	35
C.2.4.2. L'activité procoagulante.....	36
C.3. L'hyperglycémie et le transport endothélial du glucose.....	37
C.4. Dysfonctions endothéliales dans le diabète.....	39
D. LA DEGLYCATION DES PROTÉINES.....	42

D.1. La transglycation.....	42
D.1.1. Le glutathion.....	44
D.1.2. La pyridoxamine.....	44
D.1.3. La carnosine.....	45
D.1.4. La taurine.....	46
D.2. La deglycation enzymatique par la fructosamine-3 kinase.....	46
E. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	49
F. RESULTATS.....	62
G. DISCUSSION.....	86
H. BIBLIOGRAPHIE.....	100

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : La liste des protéines endothéliales du poumon de rat, glyquées.....	83
-----------------------------------------------------------------------------------------	-----------

LISTE DES FIGURES

- Figure 1:** Mécanismes biochimiques susceptibles d'expliquer la relation entre l'hyperglycémie (et l'augmentation de la concentration intracellulaire de glucose) et les complications diabétiques (angiopathie et neuropathie). La production des radicaux libres semble jouer un rôle central dans cette relation.....**10**
- Figure 2:** La production de sorbitol et de fructose à partir de glucose, par la voie des polyols. La superproduction de NADP^+ et de NADH , conduit à l'augmentation du stress oxydatif avec des conséquences sur la prolifération cellulaire, l'apoptose et les complications vasculaires.....**12**
- Figure 3:** Schéma simplifié des étapes de formation des produits avancés de glycation. Ce schéma comporte seulement une des multiples réactions qui conduisent vers la multitude des produits avancés de glycation (toujours incomplètement caractérisés).....**17**
- Figure 4:** Le processus de transglycation sans intervention enzymatique.....**43**
- Figure 5:** Le rôle catalytique de la FN3K dans la décomposition du fructoselysine (FL). La phosphorylation de FL en fructoselysine-3-phosphate (FL3P) est suivie de la formation de lysine, de 3-deoxyglucosone (3DG) et de phosphate anorganique (Pi).....**47**
- Figure 6:** Immunisations des cellules endothéliales pulmonaires de rat.....**57**

Figure 7 : Caractérisation du système de détection des protéines glyquées: Les anticorps anti-glucitolysine (A) et anti-glucitol-6-phosphate-lysine (B) reconnaissent uniquement leurs épitopes spécifiques. Test de spécificité, par immunobuvardage, contre des :

-produits précoces de glycation : BSA-glucose, BSA-fructose, BSA-glucose-6-phosphate (G6P), BSA-glyceraldéhyde-3-phosphate (Gald3P)
 -produits terminaux de glycation: BSA-carboxyméthyllysine (CML), BSA-carboxyéthyllysine (CEL).....**69**

Figure 8 : Les anticorps ne reconnaissent que le produit de glycation réduit par NaBH₄ (à droite). Immunobuvardage avec des anticorps anti-glucitolysine.....**70**

Figure 9 : Quantités différentes d'albumine glyquées ont été réduites avec NaBH₄ avant (A), et après l'électrophorèse (B). L'électrophorèse n'entraîne pas de dégradation des produits de glycation non-réduits.....**71**

Figure 10 : Homogénats de poumon de rat diabétique. Immunobuvardage avec des anticorps anti-glucitolysine (A). L'intensité du signal immunochimique (ECL) est proportionnelle à la quantité des produits glyqués (B).....**72**

Figure 11 : Évaluation du niveau de glycation dans différents organes du rat diabétique. Coloration en Rouge Ponceau (A). Immunobuvardage avec des anticorps glucitolysine (B) et glucitol-6-phosphate-lysine (C) effectué sur des organes des rats diabétiques et normaux. N-animaux contrôle, normoglycémiques; D-animaux diabétiques (3 mois).....**73**

Figure 12 : Évaluation quantitative du niveau de glycation par intégration densitométrique effectuée sur l'immunobuvardage avec anti-glucitolysine (A) et anti-glucitol-6-phosphate lysine (B). N-animaux contrôle, normoglycémiques; D-animaux diabétiques (3 mois).....74

Figure 13 : L'augmentation du niveau de glycation par le glucose et glucose-6-phosphate au cours du diabète dans de différents organes du rat.....75

Figure 14 : Poumon de rat perfusé avec des billes magnétiques (4.5µm) recouvertes d'anticorps anti ACE. Coupe semifine, coloration par bleu de toluidine.....76

Figure 15 : Cellules endothéliales de poumon de rat immuno-sélectionnées avec des anticorps anti enzyme de conversion d'angiotensine (ACE) immobilisées sur des billes magnétiques. Immunofluorescence avec l'anticorps pan endothélial CD34 (A, B et C) comparativement aux images des mêmes cellules enregistrées en lumière visible (D, E et F). Séries d'images de cellules endothéliales dispersées (A, D) et en amas (B, E). Le contrôle exclut l'anticorps primaire..... 77

Figure 16 : Enrichissement en ACE des cellules immunosélectionnées. Immunobuvardage avec anticorps anti ACE d'homogénat du poumon, des cellules non liées par les billes magnétiques et des cellules ayant des billes magnétiques attachées (A). Quantification densimétrique de l'intensité du signal immunochimique (B).....78

Figure 17 : Profil électrophorétique des principales fractions du protocole d'isolation des cellules endothéliales pulmonaires. Coloration à l'argent.....79

Figure 18 : Le niveau de glycation des protéines dans principales fractions du protocole d'isolation des cellules endothéliales pulmonaires. Immunobuvardage avec anti glucitolysine (A) et évaluation densitométrique du signal immunochimique (B).....80

Figure 19 : Localisation des protéines glyquées dans le profile électrophorétique bidimensionnel des cellules endothéliales du poumon de rat diabétique. A- coloration par Sypro Ruby sur membrane de nitrocellulose (NC). B- immunobuvardage avec anti glucitolysine.....81

Figure 20 : Le spectre des protéines endothéliales de poumon de rat (800µg). Coloration par Sypro Ruby sur gel et identification des protéines endothéliales glyquées. Les spots les plus intensément colorées ont été coupées et analysées en spectrométrie de masse (LC-QTOF).....82

Figure 21 : L'effet des inhibiteurs de la formation des AGEs sur la stabilité des produits de glycation précoce. BSA glyquée par D-glucose, incubée avec un excès molaire de 1 000 de: L-lysine et pyridoxamine (A), glutathion et L-carnosine (B) au moment initial (T_0) et 7 jours après (T_7).....84

Figure 22 : Les protéines de cellules de la ligne RBE₄ cultivées pour 12 jours dans des conditions hyperglycémiques (30 mM glucose) restent très faiblement glyquées par rapport

à l'homogénat de poumon du rat diabétique. N hom.- homogénat de poumon de rat normoglycémique; D hom.- homogénat de poumon de rat diabétique;

A – immunobuvardage avec des anticorps anti glucitollysine; B – évaluation densimétrique du signal immunochimique.85

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ACE	Angiotensin Converting Enzyme Enzyme de conversion de l'angiotensine
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AGEs	Advanced Glycation End-products Produits de glycation avancée
AR	Aldose réductase
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ATP	Adénosine Triphosphate
ATPase	Adénosine Triphosphatase
BSA	Bovine Serum Albumin Albumine de sérum bovin
bFGF	Facteur basique de croissance des fibroblastes
CaBP1	Calcium binding protein 1
cAMP	Adénosine MonoPhosphate cyclique
CEL	Carboxyethyllysine
CD34	Classe de differenciation 34
cGMP	Guanosine Mono Phosphate cyclique
CML	Carboxymethyllysine
DAG	Diacylglycérol
DID	Diabète Insulino-dépendant
3DG	3-deoxyglucosone
DNID	Diabète Non-Insulino-dépendant
ECL	Electrochemiluminescence

ECM	Extracellular matrix Matrice extracellulaire
EDCF	Endothelium Derived Contracting Factor Facteur de contraction dérivé de l'endothélium
EDHF	Endothelium derived Hyperpolarizing Factor Facteur d'hyperpolarisation dérivé de l'endothélium
EDRF	Endothelium Derived Relaxing Factor Facteur de relaxation dérivé de l'endothélium
EGF	Epidermal Growth Factor Facteur de croissance de l'épiderme
eNOS	endothelial Nitric Oxide Synthase Nitrique oxyde synthase endothéliale
ET	Endothéline
FGF	Fibroblast growth factor Facteur de croissance des fibroblastes
FL3P	Fructosyl-3 phosphate-lysine
FN3K	Fructosamine-3-kinase
Gald3P	Glyceraldéhyde 3 phosphate
GDP	Guanosine diphosphate
GLUT	Transporteur du glucose
G6P	Glucose-6 phosphate
Gp96	Glycoprotéine de 96 kDa
GSH	Glutathion
GSX	Glutathion peroxydase
GTP	Guanosine triphosphate

GTPase	Guanosine triphosphatase
HRP	Horseradish peroxidase
HSP	Heat Shock Protein
i	Inhibiteur
ICAM	Intercellular adhesion molecule Molécule d'adhésion intercellulaire
Ig	Immunoglobulin
IP3	Inositol 1, 4, 5-triPhosphate
LDL	Low Density Lipoprotein Lipoprotéine de faible densité
MAPK	Mitogen Activated Proteine Kinase Protéine kinase activée par des agents mitogènes
MHC I	Complexe majeur d'histocompatibilité (class-I)
mRNA	Messenger RNA RNA messenger
NAD⁺	Nicotinamide Adénine Dinucleotide
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucleotide réduite
NADP⁺	Nicotinamide Adénine Dinucleotide Phosphate
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucleotide Phosphate réduite
NF-kB	Nuclear Factor -kB
N-terminale	Amino-terminale
NO	Nitric Oxide Oxyde nitrique
NOS	NO synthase
'O₂⁻	Anion superoxyde

PAI	Plasminogen Activator Inhibitor Inhibiteur de l'activateur du plasminogène
PBS	Tampon phosphate saline
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PGF	Placental Growth Factor Facteur de croissance placentaire
PGI₂	Prostacycline
Pi	Phosphate anorganique
PI3 kinase	PhosphoInositide 3-kinase
Psgl-1	P-sélectin glycoprotéine ligand 1
PKC	Protéine-Kinase C
RAGE	Receptor for Advanced Glycation Endproducts Récepteur pour les produits de glycation avancée
RBE₄	Cellules endothéliales immortalisées, de la microvascularisation de cerveau de rat
ARN	Ribonucleic acid Acide ribonucléique
ROS	Reactive Oxygen Species Radicaux libres d'oxygène
SDH	Sorbitol déshydrogénase
SDS	Sodium dodecylsulfate
SGLT	Transporteurs pour le glucose: Na ⁺ dépendantes
SNAPs	Soluble NSF Attachment Proteins Protéines solubles attachant le NSF aux membranes

SNAREs	SNAPs Receptors Récepteurs des protéines SNAPs
STZ	Streptozotocine
TBS	Tampon Tris-saline
Tf	Tissue factor Facteur tissulaire
TGF-β	Transforming growth factor beta Facteur de croissance transformant bêta
TNF-α	Tumor Necrosis Factor Alpha Facteur de nécrose tumorale alpha
tPA	tissue Plasminogen Activator Activateur du plasminogène tissulaire
tSNAREs	Target-associated SNAP Receptors Récepteurs des protéines SNAPs associés aux compartiments cibles
UKPDS	The United Kingdom Prospective Diabetes Study
VCAM	Vascular cell adhesion molecule Molécule d'adhésion de cellule vasculaire
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
vSNAREs	Vesicle-associated SNAP Receptor Récepteurs des protéines SNAPs associés aux vésicules
VVO	Vesiculo-Vacuolar Organelles Organites vesiculo-vacuolaires
vWF	Facteur von Willebrand

DÉDICACE

À ma fille Andreea et à mon époux Gabriel,

Merci de m'avoir supportée et encouragée avec amour tout au long de mes études.

La chaleur de vos âmes m'a donné l'énergie de réaliser tout ce que j'ai fait.

Je vous aime....

REMERCIEMENTS

Pour la confiance qu'il m'a accordée en me permettant de réaliser ce travail de thèse, je tiens à remercier mon directeur de recherche, **Docteur Lucian Ghitescu**. Je lui suis reconnaissante de l'intérêt qu'il a témoigné à mes recherches, et de son implication dans le bon déroulement de ces deux années, tant sur le plan pédagogique que scientifique. Merci aussi pour toute l'aide, la patience et le soutien accordés avec générosité durant mes études.

Je tiens à exprimer, mes sincères remerciements au **Docteur Moïse Bendayan** pour le soutien et les précieux conseils scientifiques qui m'ont bien aidé tout au long de ma maîtrise. Merci de m'avoir ouvert les portes de votre labo.

Je remercie **Docteur Irène Londoño**, dont la gentillesse et la chaleur ont été d'un grand support. Ses qualités humaines et sa rigueur scientifique m'ont donné la confiance de poursuivre avec enthousiasme le complexe univers de la recherche.

Je suis très reconnaissante envers **Diane Gingras** pour ses conseils, son aide inestimable et la patience qu'elle a gentiment témoignée envers moi tout au long de ces années.

Je voudrais remercier sincèrement **Casimir** pour son amitié, pour les conseils, les encouragements, l'écoute et le soutien pendant ces deux ans.

Merci à mes parents, de m'avoir toujours soutenue, merci pour votre confiance et les sacrifices que vous avez faits. Merci aussi à ma sœur de m'avoir toujours encouragé...merci pour tout.

INTRODUCTION

Le diabète constitue un problème majeur de santé publique en raison de la gravité de ses complications. Une glycémie toujours élevée cause des dommages à long terme et provoque la dysfonction de divers organes comme les reins, les yeux, les nerfs, le cœur et les vaisseaux sanguins. En effet le diabète est associé à un groupe hétérogène de maladies, les angiopathies diabétiques représentant une cause de mortalité particulièrement grave. Un mauvais contrôle glycémique constitue un important facteur de risque dans la pathogenèse des complications chez les patients diabétiques. *(UKPDS, 1998)*

Le but de ce projet est d'identifier les protéines des cellules endothéliales qui sont ciblées par la réaction de glycation au cours du diabète.

A. LE DIABETE SUCRÉ ET SES COMPLICATIONS

A.1. Le diabète

Le diabète sucré est une maladie métabolique caractérisée par une hyperglycémie chronique. Cette hyperglycémie résulte d'une carence en insuline et/ou une diminution de la sensibilité tissulaire à cette hormone. L'insuline est la seule hormone hypoglycémiante de l'organisme. Elle est sécrétée par les cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas et aide à convertir le glucose en énergie. L'insuline agit sur la grande majorité des cellules en se liant à son récepteur et provoquant une cascade d'événements cellulaires qui aboutissent

à la pénétration du glucose dans les cellules cibles. L'action tissulaire de l'insuline peut se résumer de la manière suivante:

- elle stimule l'absorption du glucose sanguin par les tissus dits insulino-dépendants (muscles squelettiques, cellules des graisses et du foie)
- elle inhibe la production du glucose (glycogénolyse) dans le foie et la lipolyse dans les adipocytes
- elle facilite la synthèse du glycogène et des triglycérides dans le foie et le tissu adipeux pour stocker ainsi le glucose en excès.

Il y a plusieurs formes de diabète: le type 1, le type 2 et le diabète gestationnel. Le diabète de type 1 et de type 2 sont les deux formes les plus répandues de cette affection chronique et touchent environ 10% respectivement 90% de la population des personnes diabétiques (*Agence de santé publique du Canada*).

A.1.1. Le diabète insulino-dépendant

Le diabète de type 1 ou le diabète insulino-dépendant (DID) est aussi appelé le diabète juvénile. C'est une maladie auto-immune, caractérisée par la destruction de la cellule bêta des îlots de Langerhans du pancréas. Elle est associée à la production d'anticorps dirigés contre différents auto-antigènes des cellules bêta: gangliosides, sulfatides, acide glutamique, insuline, etc. (*Gillard et al., 1989; Andersson, Buschard et Fredman, 2002; Buschard et al., 2005*).

La carence profonde en insuline est responsable d'une hyperglycémie, qui découle d'une augmentation de la production hépatique de glucose (par l'augmentation de la néoglucogenèse et de la glycogénolyse) d'une diminution de l'utilisation périphérique du glucose, accompagnée d'une augmentation de la lipolyse périphérique. Elle provoque également l'afflux d'acides gras libres vers le foie et une diminution de l'anabolisme protéique. La cétonogenèse hépatique (acide acéto-acétique, acide β -hydroxy-butyrique, acétone) est accrue par l'afflux d'acides gras libres, la carence insulinique et l'excès de glucagon (*Beylot, 1996*). L'excrétion urinaire des corps cétoniques sous forme anionique favorise la perte de cations (Na^+ , K^+) et l'ionisation des corps cétoniques entraîne un apport massif d'ions H^+ responsable de l'acidose (*Marré, 1997; Charfen et Frackelton, 2005*).

Une cause possible de diabète de type 1 est la susceptibilité des gènes du complexe d'histocompatibilité de classe II qui prédisposent l'individu au développement d'une réponse auto-immunitaire contre les cellules pancréatiques bêta. Certains facteurs environnementaux nocifs tels que les toxines et les virus sont considérés comme de causes possibles du diabète de type 1 (*Muir, Schatz et Maclaren, 1992*).

A.1.2. Le diabète non insulino-dépendant

Le diabète non insulino-dépendant (DNID) ou le diabète de type 2 représente 90% des cas de diabète et apparaît chez l'homme vers l'âge de 40 ans. Le diabète de type 2 présente une pathologie plus complexe, qui inclut une perte de la sensibilité tissulaire à l'insuline (insulino-résistance) et une anomalie dans sa sécrétion en réponse au glucose. A ce trouble du métabolisme glucidique, s'associent des troubles complexes du métabolisme lipidique.

Les causes du DNID sont liées à des facteurs génétiques et à des facteurs environnementaux comme l'excès de poids et une alimentation déséquilibrée associée au sédentarisme (*Pirart, 1977*).

Il y a presque 90 ans, la découverte de l'insuline a permis pour la première fois de traiter le diabète. Cette maladie autrefois mortelle est présentement une maladie chronique avec de nouvelles perspectives de traitement. Aujourd'hui, on espère que la régénération endocrine du pancréas par la transplantation des cellules souches embryonnaires productrice d'insuline soit une technique capable de guérir le diabète (*Ibii et al., 2007*). Malheureusement, sans connaître les causes exactes de l'apparition du diabète il demeure impossible de le prévenir.

Un facteur important commun aux deux types de diabète est l'hyperglycémie. Un taux élevé de glucose dans le sang entraîne une altération du milieu intracellulaire et peut provoquer des dommages spécifiques pour chaque tissu[!]. Dans ce travail nous avons montré que la cellule endothéliale grâce à sa position à l'interface entre le sang et les tissus est une cible préférentielle de glycation qui représente un mécanisme possible de la pathologie vasculaire associée au diabète.

A.2. Les complications liées au diabète

Les complications les plus fréquentes du diabète qui entraînent les séquelles les plus graves se retrouvent au niveau des vaisseaux sanguins. Ces complications sont dues à des

modifications structurelles et fonctionnelles des gros (**macroangiopathie**) et des petits vaisseaux (**microangiopathie**) de certains tissus.

A.2.1. Les complications macrovasculaires

La macroangiopathie diabétique correspond à l'ensemble des lésions artérielles, secondaires au diabète. Il s'agit des dommages aux grandes artères menant au cerveau, au cœur, aux jambes et aux pieds. Elle consiste essentiellement en une athérosclérose accélérée conduisant à un risque accru d'accidents cardiovasculaires et constitue la première cause de mortalité au cours du diabète (*Leutenegger, 1995*).

La paroi de l'artère normale est constituée³ de trois tuniques: l'intima (comprenant l'endothélium et le tissu conjonctif sous endothélial), la media (séparée de l'intima par la limitante élastique interne) et l'adventice. La première étape de l'athérosclérose consiste dans la pénétration passive et l'accumulation des lipoprotéines de basse densité (LDL) dans l'intima. Les dysfonctions de l'endothélium sont en rapport avec la présence des LDL oxydés et entraînent des phénomènes de vasoconstriction anormale en réponse aux stimuli qui normalement déclenchent une vasodilatation artérielle (ex: l'acétylcoline) ainsi que l'accumulation des cellules spumeuses, la prolifération des cellules musculaires dans l'intima et l'inflammation. On peut noter que les maladies coronariennes sont la principale cause de décès chez les diabétiques et que le diabète demeure avec l'hypertension un des plus importants facteurs de risques d'accidents vasculaires (plus de 60 % des diabétiques en souffrent) (*Wilson, Anderson et Kannel, 1986*).

A.2.2. Les complications microvasculaires

La microangiopathie diabétique consiste en altérations structurelles et fonctionnelles des petits vaisseaux de diamètre inférieur à 20 μ m (artérioles, capillaires, veinules). Les complications **microvasculaires** se manifestent à long terme et sont identifiées cliniquement dans les vaisseaux sanguins de la rétine, des reins et des nerfs.

A.2.2.1. La rétinopathie touche 97 % des diabétiques de type 1 et 80% de ceux qui souffrent du diabète de type 2 (*Moss, Klein et Klein, 1998*). Elle est la principale cause de cécité chez les adultes (*Fong et al., 2004*). Cette maladie se caractérise par une atteinte progressive, structurale et fonctionnelle des microvaisseaux rétiniens. Dans les capillaires de la rétine, le rapport normal péricytes/cellules endothéliales est de 1:1. On pense que l'exceptionnelle durée de vie des cellules endothéliales de la microvascularisation rétinienne soit liée à ce rapport. Après quelques années de diabète le rapport péricytes/cellules endothéliales, baisse jusqu'à 1:4 - 1:10. La disparition des péricytes est accompagnée d'une prolifération endothéliale intense, donc une neovascularisation, de la formation des microanévrismes, d'une hypertrophie de la membrane basale et d'une augmentation de la perméabilité capillaire (*Yamagishi et Imaizumi, 2005*). La glycation des protéines au niveau de la cornée conduit à la formation d'agrégats de hauts poids moléculaires qui réfléchissent la lumière. La conséquence clinique sera l'apparition de cataracte qui entraîne finalement la cécité (*Monnier, 1993*).

A.2.2.2. La néphropathie diabétique est la complication la plus sévère liée au diabète et conduit progressivement à une insuffisance rénale grave. Au niveau glomérulaire, la

néphropathie diabétique est causée par une altération structurale de la membrane basale, due à une augmentation de la quantité de collagène de type IV (*Bendayan, 1985; Kim et al., 1991; Fukui et al., 1992; Roy, Maiello et Lorenzi, 1994; Doucet et al., 2000*) et à une diminution de la quantité de protéoglycanes (*Parthasarathy et Spiro, 1982; Rohrbach et al., 1982*). La quantité de la fibronectine ne semble pas être modifiée au cours du diabète (*Shimomura et Spiro, 1987*), tandis que certaines études soutiennent une augmentation (*Rohrbach et al., 1982*) et d'autres une diminution de la quantité de laminine au cours du diabète (*Shimomura et Spiro, 1987*). La synthèse réduite de protéoglycanes d'héparan sulfate entraîne une diminution de la quantité des charges négatives de la membrane basale et compromet la capacité de celle-ci de restreindre le passage des molécules anioniques (*Kanwar et al., 1983; Rohrbach, 1986; Kobayashi et al., 1989; Moriya et al., 1993; Tamsma et al., 1994*).

Non seulement la quantité, mais aussi la distribution spatiale des composants de la membrane basale sont altérées au cours du diabète (*Desjardins et Bendayan, 1990; Inoue et Bendayan 1995*). Ce réarrangement de la structure de la membrane basale serait responsable des altérations fonctionnelles de celle-ci (*Bendayan, Gingras et Charest, 1986; Desjardins et Bendayan, 1990*), particulièrement de l'augmentation de la perméabilité glomérulaire au cours du diabète.

A.2.2.3. La neuropathie diabétique est une complication d'une pathogénie très complexe. Elle se développe au cours des 10 premières années du diabète chez 40 à 50 % des personnes diabétiques de type 1. L'hyperglycémie chronique est un facteur important qui induit des altérations des fibres nerveuses et des microvaisseaux des nerfs, et se traduit par

une perte sensorielle au niveau des pieds. La neuropathie peut causer des ulcères à l'extrémité du pied diabétique, aboutissant parfois à l'amputation (*Tooke et Brash, 1996*). Bien qu'il y ait eu des progrès significatifs dans les aspects cliniques, beaucoup des questions demeurent sans réponse en termes de cause, facteurs de risque, susceptibilité génétique, traitements et restauration efficace des fonctions des nerfs, et gestion de la douleur.

B. LES MECANISMES DE L'EFFET TOXIQUE DU GLUCOSE

Des études effectuées au cours du temps ont montré qu'il y a une concordance certes entre l'hyperglycémie chronique et le développement des complications micro et macrovasculaires dans le diabète de type 1 et de type 2. Quelques mécanismes moléculaires ont été proposés pour expliquer l'initiation et la progression des lésions vasculaires (*Wautier et Guillausseau, 1998; Setter, Campbell et Cahoon, 2003; Wolf G, 2005*):

- 1) l'hyperactivité de la sorbitol-aldose réductase,
- 2) l'hyperactivité des différentes isoformes de la protéine kinase C (PKC),
- 3) l'augmentation du stress oxydatif,
- 4) l'augmentation de la glycation des protéines avec la formation irréversible et l'accumulation des produits terminaux (avancés) de glycation (PTAG) dans les tissus (Fig. 1).

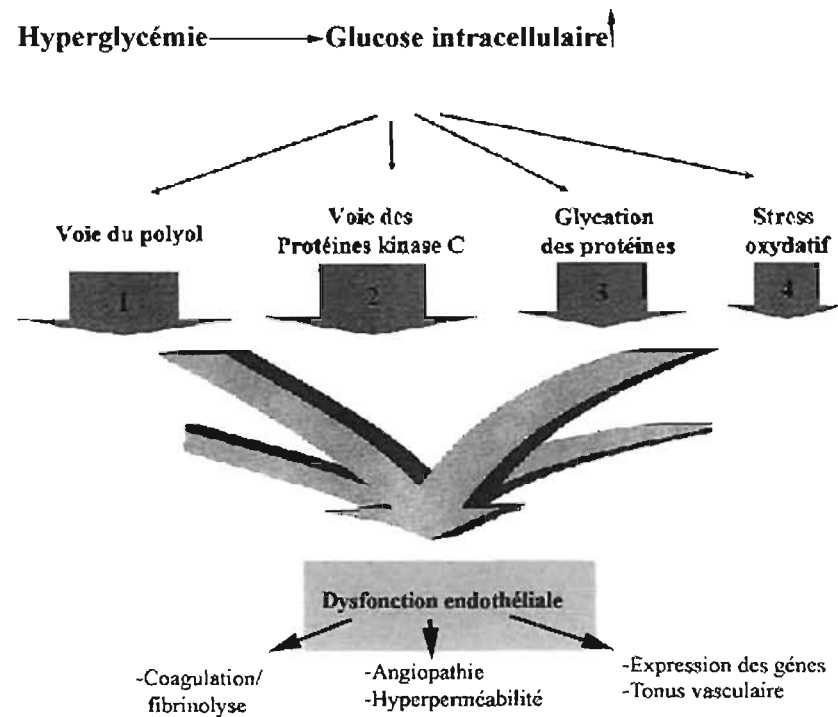


Figure 1: Mécanismes biochimiques susceptibles d'expliquer la relation entre l'hyperglycémie (et l'augmentation de la concentration intracellulaire de glucose) et les complications vasculaires associés au diabète (angiopathies). La production des radicaux libres semble jouer un rôle central dans cette relation (*Image modifiée après Defraigne, 2005*).

B.1. La voie métabolique des polyols

Les cellules utilisent le glucose comme source d'énergie, mais l'excès du glucose entre normalement dans la voie métabolique des polyols où le glucose est réduit en sorbitol. La réaction de transformation du glucose en sorbitol est catalysée par l'enzyme aldose réductase (AR). Elle est une oxydoréductase cytosolique avec une faible affinité pour le

glucose et, par conséquent, la quantité de sucre suivant cette voie est très réduite chez les personnes ayant une glycémie normale. Dans un environnement hyperglycémique, la concentration intracellulaire élevée de glucose induit une conversion accrue du glucose en sorbitol. L'oxydation de NADPH en NADP^+ accompagne cette réaction. L'épuisement de NADPH diminue la production intracellulaire de glutathion réduit et d'oxyde nitrique. Celle-ci altère la capacité de la cellule endothéliale de répondre aux défis oxydatifs et de jouer son rôle modulateur dans la vasodilatation (*Green, Lattimer et Sima, 1988*) (Fig.2).

A son tour, le sorbitol est oxydé en fructose par l'enzyme sorbitol déshydrogénase (SDH), avec la réduction concomitante du NAD^+ en NADH (*Brownlee, 2001*). Un niveau élevé de NADH stimule la formation de lactate qui est un signe de pseudo-hypoxie (*Ziyadeh., 1995*). En même temps une diminution de NAD^+ entraîne une augmentation du triosephosphate (*Williamson et al., 1993*) ayant comme effet une augmentation de la production de methylglyoxal, le précurseur d'un activateur de la protéine kinase C, le diacylglycérol (DAG) (voir plus loin).

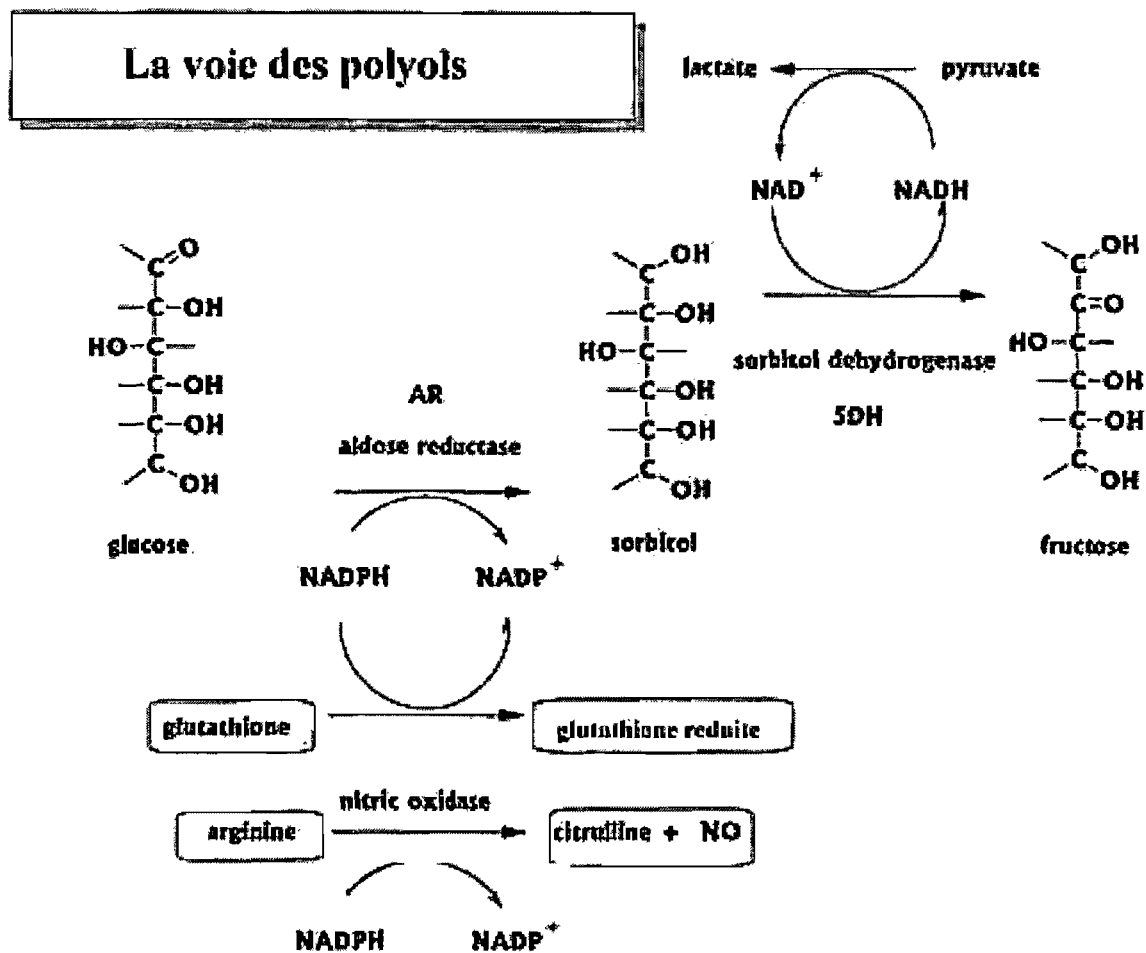


Figure 2: La production de sorbitol et de fructose à partir de glucose, par la voie des polyols. La superproduction de NADP^+ et de NADH , conduit à l'augmentation du stress oxydatif avec des conséquences sur la prolifération cellulaire, l'apoptose et les complications vasculaires (*Image modifiée après Benhamou, 1991*)

De nombreux mécanismes ont été proposés pour expliquer l'effet nocif de l'hyperglycémie par la voie du polyol. Le premier mécanisme suppose que le sorbitol accumulé à l'intérieur des cellules peut induire un stress osmotique parce qu'il ne peut pas

traverser facilement la membrane plasmique. Un autre mécanisme suggère qu'il y a une diminution de l'activité de Na^+/K^+ -ATPase. L'hyperglycémie augmente l'activité cytosolique de la phospholipase A_2 , qui induit la formation de deux inhibiteurs de Na^+/K^+ -ATPase: l'arachidonate et la prostaglandine E_2 (PGE_2) (Xia, Kramer, et King, 1995). Jusqu'à présent quelques inhibiteurs d'aldose réductase ont été synthétisés et testés: sorbinil, statil, tolrestat, et zopolrestat (Kador, Robison et Kinoshita, 1985; Dvornik, 1992; Tsai et Burnakis, 1993; Pfeifer, Schumer et Gelber, 1997), mais l'utilisation de ces inhibiteurs dans les études cliniques est limitée par leur grande toxicité.

B.2 L'activation de la protéine kinase C

L'hyperglycémie peut conduire à une formation accrue de diacylglycerol (DAG), ce qui entraîne une activation de la protéine kinase C (PKC). Les anomalies vasculaires qui en résultent sont traduites dans une augmentation de la perméabilité vasculaire par des changements au niveau des jonctions interendothéliales (Way, Katai et King, 2001), une altération de la traduction du signal et dans un épaissement de la membrane basale. La grande famille des protéines kinases C comprend plusieurs isoformes, dont $\text{PKC}\beta_2$ est dominante au niveau des cellules endothéliales, du muscle lisse et de la rétine (Inoguchi et al., 1992 ; Kunisaki et al., 1994). L'activation de la voie de DAG-PKC détermine l'augmentation de la perméabilité vasculaire par plusieurs mécanismes, dont la phosphorylation des protéines du cytosquelette (le caldesmon, la vimentine, la taline et la vinculine) et la surexpression du $\text{TGF}\beta$ et du VEGF, dans les cellules endothéliales (Williams et al., 1997; Way, Katai et King, 2001). A son tour, le $\text{TGF}\beta$ détermine la surexpression des composants de la matrice extracellulaire ce qui conduit à

l'épaississement de la membrane basale endothéliale au cours du diabète. Il a été démontré que les inhibiteurs de PKC diminuent l'expression de TGF β et empêchent l'expansion du mésangium dans la néphropathie diabétique (*Ishii, Koya et King, 1998*). La ruboxistaurin, un inhibiteur de la PKC β 2, a été utilisée dans la normalisation de la dysfonction endothéliale chez les patients diabétiques (*Lang, 2007*). Également, l'augmentation de la perméabilité vasculaire induite par le VEGF peut être corrigée par le LY333531, un autre inhibiteur de PKC β (*Brownlee, 2001*).

B.3 Le stress oxydatif

L'état diabétique est accompagné d'un stress oxydatif accru et d'un taux élevé des radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS) (*Stehouwer et al., 1997*). Les ROS sont générés par plusieurs voies biochimiques, étroitement liées à l'hyperglycémie: l'autooxydation du glucose, la voie des polyols, la synthèse des prostanoïdes et la formation des produits de glycation nonenzymatique. (*Gugliano, Paolisso et Ceriello, 1996; De Vriese et al., 2000*). Le stress oxydatif détermine un surcroît de la concentration intracellulaire de Ca²⁺, qui détermine une augmentation de la perméabilité endothéliale par plusieurs voies: des réarrangements du cytosquelette, l'activation de l'eNOS ou du PKC (*Shasby et al., 1985; Yuan et al., 1993; Siflinger-Birnboim et al., 1996; Williams et al., 1997*). Le rôle du stress oxydatif dans la dysfonction endothéliale diabétique justifie les approches thérapeutiques et préventives de la micro angiopathie par des agents anti-oxydants. L'administration à long terme d'un régime antioxydant empêche le développement de la rétinopathie diabétique chez les rats (*Kowluru, 2001; Kowluru, Tang et Ken, 2001*) et l'administration de la

vitamine C préserve la capacité vasodilatatrice de l'endothélium chez les patients diabétiques (*Ting et al., 1996*).

Au niveau moléculaire, des données récentes démontrent que l'excès de glucose modifie l'expression des nombreux gènes et induit des mutations dans l'ADN mitochondrial (*Fischel-Ghodsian, 2001*).

B.4. La glycation des protéines

B.4.1. L'origine des produits de glycation

Une des conséquences essentielles de l'hyperglycémie est la glycosylation non-enzymatique ou la glycation des protéines. Le phénomène de glycation est le résultat de la fixation d'un sucre réducteur (hexoses comme: glucose et fructose; pentoses comme: ribose et xylulose; galactose, mannose, ascorbate) sur le groupe NH_2 libre de différents molécules: protéines, acides nucléiques et lipides. En ce qui concerne les protéines, la cible principale pour ces modifications postraductionnelles est le groupe $\epsilon\text{-NH}_2$ des lysines et le groupe guanidine des arginines. Dans le cas du glucose et du fructose les produits ainsi formés sont des glucosylamines, et des fructoselysines respectivement (*Henle et Miyata, 2003*). En effet cette réaction comporte trois étapes: la formation d'une base Schiff, le réarrangement Amadori et la formation des produits terminaux de glycation (Fig. 3).

a) La première étape comporte la formation réversible d'une base de **Schiff**, labile, par la combinaison de la fonction aldéhyde ou cétone du sucre avec les résidus aminés des protéines.

b) L'étape **d'Amadori** se caractérise par des réarrangements moléculaires à l'intérieur de la base Schiff aboutissant à des produits plus stables que les bases Schiff-les produits Amadori. Cette réaction arrive à l'équilibre après quelques semaines (*Brownlee, Cerami et Vlassara, 1988*). Cette étape dépend de la concentration du sucre, de la réactivité de celui-ci, de la durée de vie des protéines et caractérise les protéines d'une demi-vie brève ou intermédiaire. Un exemple en ce sens est l'hémoglobine, dont la forme glyquée augmente significativement au cours du diabète.

c) Dans une troisième étape, des réactions de cyclisation, oxydation et déshydratation moléculaire irréversibles, conduisent vers les produits terminaux (avancés) de glycation (PTAG) ou produits de **Maillard** (en mémoire du découvreur de ces composés). Ils ont une couleur jaune-brune, sont insolubles et parfois fluorescents. Le taux de formation de ces composants est indépendant de la concentration en sucre du milieu, mais dépend de la durée de l'hyperglycémie et de la durée de vie des protéines. Ces produits s'accumulent dans les tissus des personnes diabétiques et concernent particulièrement les protéines d'une demie vie prolongée, comme le collagène (*Meng et al. 1996*), le cristallin (*Van Boekel et Hoenders, 1992*) et les histones (*Gugliucci, 1994; Gugliucci et Bendayan, 1995*).

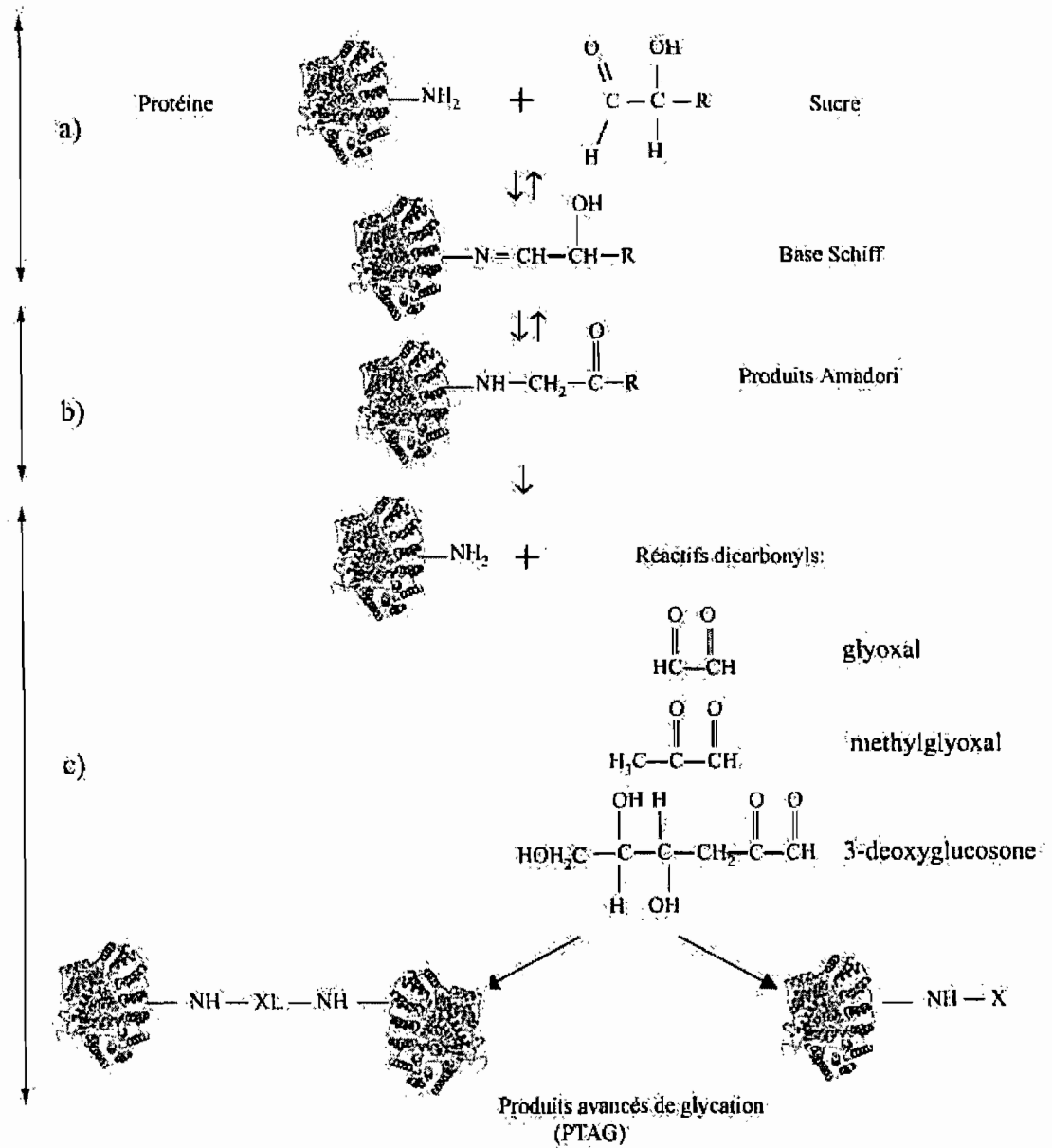


Figure 3: Schéma simplifié des étapes de formation des produits avancés de glycation. Ce schéma comporte seulement une des multiples réactions qui conduisent vers la multitude des produits avancés de glycation (toujours incomplètement caractérisés).

(Image modifiée après Ahmed et Thornalley, 2007).

Un meilleur contrôle glycémique au cours du diabète diminue la formation des produits de glycation mais n'empêche pas l'accumulation des produits terminaux de glycation. Le concept de *mémoire hyperglycémique* illustre cet aspect et se rapporte à la persistance ou à la progression des altérations microvasculaires, même après la normalisation de la concentration de glucose. L'exemple le plus saisissant est le cas des yeux des chiens diabétiques. Après 2.5 ans d'hyperglycémie les yeux de ces animaux préservaient leur aspect histologique normal, mais ils développaient une rétinopathie grave au cours d'une période subséquente, malgré le retour de la glycémie à la normale (*Engerman et Kern, 1987*). Les résultats épidémiologiques indiquent que la mémoire hyperglycémique est présente également chez les patients humains. À présent nous ignorons totalement le mécanisme biologique ou moléculaire responsable de ce phénomène.

B.4.2 Les produits terminaux, avancés de glycation (PTAG)

Les PTAG sont des molécules complexes et hétérogènes qui ont la tendance de former des agrégats protéiques (cross-linking). Les produits avancés de glycation sont d'une part le résultat final de la réaction de Maillard, et d'autre part le résultat de la glycation auto-oxydative (glycoxydation) des monosaccharides. (*Wolff SP et Dean, 1987*). La nourriture serait une source exogène de PTAG mais sa signification dans la pathologie diabétique demeure peu claire jusqu'à présent (*Cerami et al., 1997*). Tel que déjà dit, les PTAG sont particulièrement présents sur les protéines de longue durée de vie telles les protéines de la matrice extracellulaire, mais ils ont été détectés également sur des protéines intracellulaires (*Giardino, Edelstein et Brownlee, 1994*).

De nombreux types de PTAG ont été détectés dans les tissus:

- des PTAG fluorescents capables de former des liaisons croisées entre les protéines, tels la pentosidine (*McCance et al., 1993*) et la crossline, identifiées pour la première fois dans les reins des rats diabétiques (*Obayashi et al., 1996*). La dégradation d'ADN et d'ARN produit du ribose libre qui représente une source pour la formation de la pentosidine (*Booth et al., 1997*).
- des PTAG nonfluorescents comme les dilysines, l'imidasolium, alkyl formyle glycosyle pyrrole, et arginine-lysine imidazole (*Frye et al., 1998; Farmer, Ulrich et Cerami, 1988; Al-Abed et Bucala, 2000*).
- des PTAG qui s'attachent aux protéines sans former des liaisons croisées: la pyralline et N-carboxymethyllysine (CML) (*Smith et al., 1994; Reddy et al., 1995*). La CML se forme par l'oxydation des produits Amadori et pendant l'oxydation des acides gras polyinsaturés en présence des protéines. La CML est le principal produit de glycation avancé détecté *in vivo* (*Reddy et al., 1995*). Très intéressant, le taux sérique de CML est augmenté chez les patients avec une rétinopathie, tandis que chez les patients atteints d'une néphropathie il reste inchangé. Toutefois le taux de la pentosidine est élevé dans les deux cas (*Miura et al., 2003*). Ceci suggère que le rôle des PTAG dans la pathogenèse des complications diabétiques pourrait varier d'un organe à l'autre.

Trois mécanismes ont été proposés jusqu'à date pour expliquer les effets délétères des PTAG au niveau de différents tissus: la formation des agrégats protéiques, leur accumulation intracellulaire et la liaison des PTAG aux récepteurs spécifiques (*Sing et al., 2001*). Les cellules possèdent de multiples récepteurs pour les PTAG: les récepteurs «éboueurs» ou «poubelles» (*scavenger*) de types I et II des macrophages, la galectine 3 (PTAG-R₃), l'oligosaccharyl transférase-48 (PTAG-R₁) et le récepteur RAGE qui est mieux

caractérisé dans la littérature (*Stern et al., 2002*). RAGE est un récepteur multi ligand, membre de la superfamille des immunoglobulines qui se trouve à la surface des cellules du muscle lisse, des macrophages, des cellules épithéliales et endothéliales et des astrocytes. Les autres ligands qui peuvent stimuler RAGE sont: les cytokines proinflammatoires, l'amphotérine, l'amyloïde- β et autres protéines fibrillaires (*Hudson et al., 2003*). L'expression des RAGEs augmente dans les cellules au cours du diabète et au cours du processus inflammatoire. Les RAGEs fonctionnent comme un récepteur de transduction de signal pour le CML (*Kislinger et al., 1999*). Au niveau des macrophages, l'interaction des PTAG avec le RAGE cause du stress oxydatif et l'activation du facteur nucléaire de transcription- κ B (NF- κ B) par la voie de la MAP kinase (*Yan et al., 1994*) ce qui entraîne une altération profonde dans l'expression des gènes.

Des études *in vitro* ont montré qu'au cours d'une longue incubation des protéines avec différents sucres, les AGEs ont la tendance à se développer en agrégats de haut poids moléculaire (*Boulangier, Dequiedt et Wautier, 2002; Cervantes-Laurean et al., 2005*). Le matériel récolté des animaux diabétiques, et étalé par électrophorèse contient également des agrégats protéiques. Dans les tissus des animaux diabétiques des accumulations d'épitopes spécifiques aux PTAG ont été démontrées, particulièrement la carboxyméthyllysine (CML) et la pentosidine (*Sell et Monnier, 1998; Ling et al., 1998*). Cette dernière est responsable de la formation des agrégats protéiques qui s'accumulent dans la cellule au cours du temps (*Horie et al., 1997; Ling et al., 1998; Nakamura et al., 2003*). Il a été montré que les PTAG résistent à la dégradation protéolytique. En plus, dans les animaux diabétiques l'activité hydrolytique des protéasomes est altérée (*Portero-Otin et al., 1999*), phénomène qui favoriserait l'accumulation intracellulaire des protéines glyquées. Une avenue intéressante à explorer serait de voir si la glycation nuit à l'ubiquitination des protéines et donc empêcherait leur dégradation par les protéasomes.

C. LA BIOLOGIE ET LA MORPHOLOGIE DE LA CELLULE ENDOTHELIALE

Au début des recherches sur le système cardiovasculaire l'endothélium était considéré comme une simple membrane inerte séparant le sang du tissu et impliquée dans la perméabilité des vaisseaux sanguins seulement. L'accumulation et l'approfondissement des connaissances dans le domaine de la biologie et pathologie vasculaires ont conduit à une vue beaucoup plus complexe sur la cellule endothéliale. On attribue aujourd'hui à l'endothélium une cohorte de fonctions vasculaires essentielles, autres que le simple contrôle de la perméabilité: la commande de la contraction / relaxation des cellules musculaires vasculaires, le recrutement des leucocytes et des cellules cancéreuses au cours de la formation des métastases, le métabolisme des lipoprotéines et d'autres molécules du sang, le maintien de l'équilibre sang fluide / coagulation et le développement du réseau vasculaire (le processus d'angiogenèse). Cette complexité pousse certains chercheurs à traiter l'endothélium comme un organe en soi, disséminé dans tous les tissus du corps (à l'exception du cartilage).

Chez une personne adulte l'ensemble des vaisseaux sanguins comporte environ 6×10^{13} cellules endothéliales qui pèsent jusqu'à 1 kg, et couvrent une superficie d'environ 5000 m² (*Tortora et Grabowski, 1993; Augustin, 1994*). Les cellules endothéliales sont des cellules polygonales allongées dans la direction du courant sanguin. Leur taille varie en fonction du segment vasculaire qu'elles occupent et se situe entre 25 à 40 µm de longueur et 10 à 15 µm de largeur (*Simionescu M et Simionescu N, 1988*). Des différences notables dans l'ultrastructure des cellules endothéliales des capillaires sanguins, ont conduit à leur classification en endothélium de type continu, fenêtré et discontinu. On sait également que les cellules endothéliales manifestent une hétérogénéité fonctionnelle importante. D'un organe à l'autre et entre les différents segments vasculaires (artère-capillaire-veine) il y a

des particularités notables de réponse endothéliale à des facteurs vasoactifs ou induisant des pathologies. Cette hétérogénéité, structurelle et fonctionnelle, des cellules endothéliales, reflète évidemment une expression différenciée de gènes sous le contrôle des facteurs environnementaux locaux qui restent, pour l'instant, inconnus.

C.1. L'origine de la cellule endothéliale

Au cours du développement fœtal les cellules endothéliales dérivent des cellules mésenchymateuses. Des angioblastes libres apparaissent initialement dans le mésoderme et s'organisent par la suite en un réseau tubulaire primaire au cours d'un processus appelé **vasculogénèse** (*Caplice, et Doyle, 2005*). La différenciation d'une cellule mésodermique en cellule endothéliale comporte plusieurs étapes avec des mécanismes moléculaires encore inconnus, mais ce qui semble acquis aujourd'hui est l'existence d'une cellule précurseur intermédiaire, appelée hémangioblaste, ayant un potentiel de différenciation soit en cellule endothéliale, soit en cellule hématopoïétique. Le facteur de croissance vasculaire VEGF (vascular endothelial growth factor) et son récepteur tyrosine kinase représentent une voie de signalisation cruciale dans la différenciation des cellules endothéliales et le développement du système vasculaire (*Risau, 1997*).

Le processus d'angiogénèse représente un mécanisme de neovascularisation prenant naissance à partir d'un réseau capillaire qui est déjà existant. Au cours de l'angiogénèse ce sont les cellules endothéliales différenciées elles-mêmes qui, par mitose, vont fournir la matériel nécessaire à la croissance progressive du réseau vasculaire. L'angiogénèse est indispensable au développement embryonnaire mais, elle est également impliquée comme facteur essentiel dans la croissance des tumeurs solides.

C.2. Les fonctions de la cellule endothéliale

Grâce à sa position stratégique à l'interface entre la circulation sanguine et les tissus, la cellule endothéliale est en mesure d'interagir avec et / ou de modifier les éléments cellulaires et solubles du sang. Cette localisation rend possible à la cellule endothéliale de fonctionner comme transmetteur ou modulateur de signaux chimiques et mécaniques, entre la circulation sanguine et l'autre cellule importante de la paroi vasculaire, la cellule musculaire lisse.

C.2.1. Le rôle de l'endothélium dans la perméabilité vasculaire

La cellule endothéliale est polarisée, avec une face luminale directement exposée au sang, et une face abluminale en contact avec la membrane basale et le liquide interstitiel du tissu irrigué. Cette polarisation permet à l'endothélium de jouer des rôles importants dans les échanges entre le sang et le tissu, en déterminant la direction du transport des molécules, soit du front luminal vers les tissus, ou bien du front abluminal vers la lumière vasculaire (*Simionescu M et Simionescu N, 1984; 1991; Simionescu M, Gafencu et Antohe, 2002*).

La composition de la membrane plasmique des cellules endothéliales diffère entre les deux côtés (*Stolz et Jacobson, 1992; Soltau, Zhou, Laughlin, 1993; Roberts et Sandra, 1993; Tewes et Galla, 2001*) luminal et abluminal et cette différence est maintenue par la présence des jonctions serrées du côté latéral (*Simionescu M, Gafencu et Antohe, 2002*). La surface luminale est en contact direct avec toutes les molécules présentes dans la circulation sanguine. Elle est recouverte d'une mince couche de 15 jusqu'à 40 nm

d'épaisseur, appelée glycocalyx (*Luft, 1966*), formée des chaînes oligosaccharidiques, des glycosaminoglycanes, glycoprotéines, glycolipides et protéines intrinsèques de la membrane cellulaire endothéliale. La présence de sialoconjugués dans le glycocalyx fait en sorte que la surface luminale des cellules endothéliales est négativement chargée (*Simionescu M, Gafencu et Antohe, 2002*). Le glycocalyx se continue au niveau des vésicules plasmalemmales et des canaux transendothéliaux. Il est plus épais à la surface des vésicules recouvertes de clathrine et les diaphragmes des fenestrations et n'existe pas au niveau des jonctions (*Simionescu N, 1983*).

Le transport endothélial de molécules plasmatiques est un processus essentiel dans le maintien de l'homéostasie, ayant une importance vitale pour toutes les cellules de l'organisme. Au cours du temps les composants structuraux de la cellule endothéliale qui rendent possible le transport des molécules ont été définis comme: les cavéoles, les canaux transendothéliaux, les organites vésiculo-vacuolaires (VVOs) les fenestrations et les jonctions interendothéliales (*Karnovsky, 1967; Laliberté et al., 1978; Bendayan, 1980; Bendayan et al., 1986; Milici et al., 1987; Ghitescu et Bendayan 1992; Horvat et Palade, 1993; Bendayan et Rasio, 1996; Predescu et al., 1998; Bendayan, 2002*).

Le système tubulo-vésiculaire, formé par les cavéoles, les canaux transendothéliaux et les VVOs représenterait la voie de transport pour les grandes et les petites molécules (*Bendayan, 2002*). Par contre, seulement les molécules qui ont moins de 3000 Da peuvent pénétrer les jonctions (*Bendayan, 2002*).

L'hypothèse du transport transendothélial via les cavéoles: Les cavéoles sont présentes dans la majorité des cellules. Les cellules endothéliales, les cellules épithéliales pulmonaires, les adipocytes, les fibroblastes et les cellules musculaires lisses contiennent un nombre particulièrement grand de cavéoles (*Shaul et Anderson, 1998; Smart et al., 1999*). Par contre, elles ne sont pas présentes dans les globules rouges, les plaquettes et les lymphocytes (*Fra et al., 1994*). Dans certaines cellules endothéliales, les caveoles (vésicules plasmalemales) en communication avec la surface cellulaire ou libres dans le cytoplasme occupent environ 20% du volume de la cellule (*Predescu et Palade, 1993*).

En général les cavéoles sont pourvues d'un diaphragme fibrillaire, mince, d'environ 5-6 nm qui à une symétrie radiale. Les diaphragmes des cavéoles sont absents au niveau de l'endothélium continu du muscle, du cœur, de la peau et du cerveau, mais sont présents dans l'endothélium continu du poumon et dans l'endothélium fenêtré et discontinu (*Stan et al., 1999; Stan, 2002*). Le diaphragme des cavéoles contient très peu d'acide sialique (*Stan, 2002*) ce qui explique leur électroneutralité (*Simionescu M, 1981*).

Le concept de transport vésiculaire transendothélial a été énoncé en 1968 par Palade qui a suggéré que les macromolécules plasmatiques migrent d'un front endothélial à l'autre via les cavéoles. Plusieurs études ont renforcé le rôle des cavéoles dans le transport de différents marqueurs au travers de l'endothélium (*Bruns et Palade, 1968; Ghitescu et al., 1986; Ghitescu et al., 1988; Ghitescu et Bendayan 1992; Predescu D et Palade 1993; Predescu D et al., 1994; Predescu et al., 1998; Predescu S, Predescu D et Palade G, 2001*). Récemment, l'analyse des cavéoles endothéliales isolées, a révélé que ces vésicules plasmalemmales possèdent les éléments moléculaires de la machinerie générique du trafic

vésiculaire (dynamine, SNAP) (*Predescu S, Predescu D et Palade, 2001*). Le modèle de la «navette» des cavéoles entre les deux fronts de la cellule endothéliale comporte plusieurs étapes:

- l'invagination de la membrane endothéliale et la formation du puit;
- le détachement des cavéoles par le pincement de la membrane endothéliale, processus appelé fission;
- la migration des cavéoles au travers de la cellule;
- l'interaction spécifique avec la membrane cible, par un processus appelé «accostage» (docking) et
- la fusion avec la membrane cible pour décharger le contenu vésiculaire.

Ce processus de transport transcellulaire des macromolécules hydrosolubles via les vésicules plasmalemmales s'appelle transcytose (*Simionescu N, 1979, a*). Le processus se retrouve dans la majorité des cellules épithéliales, incluant les cellules endothéliales (*Mostov et Simister, 1985*).

La transcytose peut être réalisée aussi bien par un mécanisme non-spécifique que spécifique, médié par des récepteurs. La transcytose non-spécifique est le mécanisme par lequel les cavéoles transportent les macromolécules (en phase fluide) d'un front à l'autre de la cellule, sans aucune sélection. Ce type de processus a été identifié en utilisant des marqueurs injectés *in vivo*, comme le glycogène, le dextran et la ferritine qui ne réagissent pas avec les molécules présentes à la surface des cavéoles. La transcytose non-spécifique dépend de la différence de concentration des macromolécules entre les deux compartiments séparés par la cellule endothéliale, ainsi que du volume du transporteur (*Simionescu M,*

Gafencu et Antohe, 2002). La transcytose spécifique représente le processus par lequel les molécules cargo se lient à des sites spécifiques ou à des récepteurs, localisés au niveau des cavéoles, avant d'être internalisées. Plusieurs protéines plasmatiques empruntent cette voie: le LDL (*Vasile et Simionescu, 1985; Hashida et al., 1986*), l'albumine (*Ghitescu et al., 1986; Simionescu M et Simionescu N, 1986*), la transferrine (*Jefferies et al., 1984; Soda et Tavassoli, 1984*), la ceruloplasmine (*Irie et Tavassoli, 1986*), les immunoglobulines (*Simionescu M, Gafencu et Antohe, 2002*), l'insuline (*King et Johnson, 1985*).

Ce modèle est opposé à d'autres hypothèses qui soutiennent que les cavéoles sont des structures statiques, connectées de manière permanente à la membrane plasmique, qui génèrent un système interconnecté d'invaginations (*Bundgaard, Frøkjaer-Jensen et Crone, 1979; Frøkjaer-Jensen, 1980*). Occasionnellement, ce système complexe d'invagination fusionne simultanément avec les deux fronts de la mince cellule endothéliale pour former des canaux hydrophiles reliant la lumière du vaisseau sanguin à l'espace interstitiel.

L'hypothèse du transport via les canaux transendothéliaux et les vésicules plasmalemmales: Bendayan et Rasio ont observé la présence d'un système tubulaire au niveau des cellules endothéliales des vaisseaux du *rete mirabile* de l'anguille. Ils ont suggéré que cette structure pourrait être le principal responsable du transport transendothélial des macromolécules plasmatiques dans ce lit vasculaire (*Bendayan et Rasio, 1996*). D'autres études ont montré aussi la présence de courts canaux transendothéliaux qui se forment par la fusion de deux ou plusieurs vésicules plasmalemmales et qui permettent le passage des traceurs macromoléculaires au travers le corps de la cellule endothéliale (*Simionescu N, Simionescu M et Palade G, 1978; Milici,*

Furie et Carley, 1985; Hart et Pino 1986; Wagner et Chen, 1991). Il a été également suggéré (*Stan et al., 2002*) que les échanges transendothéliaux ont lieu via les vésicules plasmalemmales, mais face à une demande d'augmentation du transport, les canaux transendothéliaux peuvent s'ajouter comme voie supplémentaire. En accord avec cette hypothèse, au niveau de l'endothélium continu de l'endocarde, après 6 mois de diabète s'observent des vésicules plasmalemmales fusionnées et des canaux transendothéliaux (*Popov et al., 1996*).

Le transport au travers des fenestrations: Les fenestrations sont des structures qui se retrouvent dans les capillaires de certains lits vasculaires – muqueuse intestinales, la plupart des glandes à sécrétion endocrine, le thymus (qui d'ailleurs sécrète des facteurs de croissance pour les thymocytes) et le rein. Il est intéressant de noter que dans ces organes il y a un transport important de matériel de l'interstice vers le sang, mais le rôle des fenestrations dans cette direction reste complètement obscur. Les fenestrations (fenêtres) sont des pores ovales de 60 à 100 nm de diamètre, qui traversent le corps aminci de la cellule et qui sont fermés par un diaphragme qui ressemble à celui des cavéoles (bouton central et minces fibres radiales). Des études faites il y a trois décennies (*Simionescu N, 1979, b*) ont démontré que ces diaphragmes possèdent, sur leur front sanguin une très forte concentration des charges électriques négatives qui proviennent de l'héparane sulfate. Évidemment, une telle barrière électrique empêche le passage des molécules plasmatiques, majoritairement anioniques au travers des espaces libres de la fenestration. Il est important de souligner que le diaphragme des fenêtres ne possède pas une telle distribution de charge à son front tissulaire. La signification de ce fait nous échappe pour le moment. Probablement, les fenêtres laissent passer des petites molécules, neutres du point de vue

électrique, comme les hormones dans les capillaires des glandes endocrines ou des peptides, des acides aminés, des sucres de petite taille fraîchement absorbés par la muqueuse intestinale. Il est également intéressant de noter que, dans les capillaires glomérulaires du rein, les fenêtrées des cellules endothéliales sont dépourvues de diaphragme. Ici le rôle de barrière électrostatique est rempli par la membrane basale de ces cellules (*Bendayan, Gingras, Charest, 1986; Desjardins et Bendayan, 1989*). Encore plus notable, dans le même organe, l'endothélium des capillaires péri-tubulaires regagne leur diaphragme dans le contexte d'un transport de matériel du tissu vers le sang (la réabsorption dans les tubules rénaux)

L'hypothèse du système de transport paracellulaire via des jonctions interendothéliales: Les cellules endothéliales sont unies latéralement par des jonctions serrées (appelées aussi étanches ou occlusives), des jonctions adhérentes (zonula adherens), et des jonctions communicantes (gap). Pour l'endothélium capillaire, les jonctions serrées sont caractéristiques, mais la présence de jonctions communicantes (gap) n'a pas été confirmée (*Simionescu M, Gafencu et Antohe, 2002*). Les fentes qui existent entre les cellules endothéliales adjacentes, même si fermées par les jonctions serrées, sont toujours considérées comme une voie potentielle de passage de solutés du sang vers l'espace sous-endothélial. Le transport se ferait donc de manière passive, non-sélective, simplement par le jeu des pressions hydrostatiques et osmotiques à travers la barrière endothéliale (*Weinbaum, Tsay et Curry, 1992; Michel et Curry, 1999*). En dépit du fait que des études de microscopie électronique faites avec des traceurs de différentes tailles n'ont pas réussi à les surprendre dans l'espace jonctionnel, la théorie du transport des macromolécules plasmatiques par les jonctions interendothéliales est particulièrement favorisée par les

physiologistes, probablement à cause du fait qu'elle offre une modélisation mathématique beaucoup plus facile par rapport au transport vésiculaire, actif et sélectif. Un compromis entre les deux tendances accepte que l'eau et les solutés de taille inférieure à 6 nm traversent la barrière endothéliale par les jonctions, tandis que les macromolécules emprunteraient la voie vésiculaire (*Simionescu M, Gafencu et Antohe, 2002*).

C.2.2. Le rôle de l'endothélium dans le recrutement des leucocytes

L'inflammation représente un processus complexe qui comporte la vasodilatation, l'hyperperméabilité vasculaire (œdème) et une activation endothéliale qui aboutit au recrutement des leucocytes. En général les cellules endothéliales interagissent avec les différents éléments figurés du sang via les molécules d'adhésion. Trois types de molécules de surface sont impliquées dans l'interaction entre les leucocytes et les cellules endothéliales: les sélectines, les molécules d'adhésion de la superfamille des immunoglobulines et les intégrines. L'expression de ces molécules au cours du processus inflammatoire varie de manière spécifique en fonction du lit vasculaire et de l'agent pathogène.

Les sélectines sont des glycoprotéines transmembranaires qui contiennent dans leur domaine extra cytoplasmique des séquences de type lectine, capables de reconnaître des déterminants oligosaccharidiques. Trois variétés de sélectines sont présentement connues : le E- sélectine, présent exclusivement sur les cellules endothéliales activées, la P-sélectine propre aux plaquettes sanguines et à l'endothélium et la L-sélectine- localisée seulement à la surface des leucocytes activés (*Ley et al., 1995*). Suite à l'activation des cellules

(endothélium ou leucocytes) les sélectines sont induites et leur apparition à la face extra cytoplasmique de la membrane plasmique est rapide (quelques minutes). Elles lient des ligands qui contiennent des parties de type glycane, particulièrement des variantes de la structure sialyl-Lewis X (tetrasaccharide responsable du groupe sanguin) (*McEve, 2002*). Ce ligand se trouve sur les glycolipides des leucocytes et, sous la forme de la glycoprotéine Psgl-1 (P-sélectin glycoprotéine ligand 1), à la surface de l'endothélium. Ainsi, les cellules endothéliales et les leucocytes activés trouvent sur leur partenaire d'interaction les molécules complémentaires pour faire la liaison. La liaison intercellulaire qui en résulte est hautement spécifique mais faible, ce qui permet au leucocyte, dans cette première étape d'interaction avec l'endothélium de «rouler» à la surface de celui-ci (*Bevilacqua et Nelson, 1993; Tedder et al., 1995*).

Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires qui forment des hétérodimers par l'association de deux sous unités distinctes α et β . Particulièrement importantes dans l'adhésion des cellules (endothéliales incluses) à leur membrane basale, elles transmettent à l'intérieur de la cellule des signaux de l'extérieur, par leur association avec les éléments du cytosquelette (*Hynes, 1992*). Selon les connaissances actuelles, seulement les intégrines des leucocytes interviennent au cours du recrutement de ceux-ci par l'endothélium, en tant que ligands pour des molécules endothéliales d'adhésion appartenant à la superfamille des immunoglobulines (*Shimaoka et Springer, 2003*).

Les membres les plus importants de la famille d'immunoglobulines qui interviennent dans les interactions cellules endothéliales-leucocytes sont les ICAM-1, ICAM-2 (intercellular adhesion molecule-1,2), et VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1).

ICAM-1 est fortement exprimé par les cellules endothéliales activées par des cytokines ou par les contraintes de cisaillement local, mais ne se trouvent qu'en faibles quantités dans les cellules endothéliales au repos. Il semble que ICAM-1 exerce un contrôle dans l'arrangement des filaments d'actine (*Wang et Doerschuk, 2001*). ICAM-2 est principalement trouvé dans les cellules endothéliales au repos, ainsi que dans les leucocytes, et son expression n'est pas augmentée par l'activation des cellules. (*Springer, 1995*). VCAM-1 se lie aux intégrines $\alpha 4\beta 1$ des leucocytes. Il est exprimé à la surface des cellules endothéliales activées et est absent des cellules endothéliales au repos (*Bevilacqua et Nelson, 1993*). L'expression de VCAM-1 est réglée par les médiateurs de l'inflammation (les cytokines) et diminue lorsque la cellule est soumise à des contraintes de cisaillement (*Elices et al., 1990; Chan et al., 1992*).

C.2.3. La cellule endothéliale et le tonus vasculaire

Dans les segments artériels et veineux, le tonus vasculaire résulte d'un équilibre constant entre la contraction et la relaxation des cellules musculaires lisses. Deux sources de commande et de contrôle de la vasodilatation et de la vasoconstriction sont connues: (a) l'innervation directe des cellules musculaires de la média et (b) des signaux chimiques synthétisés et sécrétés par les cellules endothéliales et agissant sur les cellules musculaires. Les cellules endothéliales sont capables de produire des facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs en réponse aux substances neurohormonales (acétylcholine, bradykinine, adénosine triphosphate, thrombine) (*Galzi et Changeux, 1992*) véhiculées par le sang, et aux stimuli physiques tels que les forces de cisaillement. Les segments artériels sont constamment exposés aux forces hémodynamiques d'amplitudes, fréquences et directions différentes. Ces forces comportent un composant perpendiculaire à la surface des parois

vasculaires (pression statique) ayant une variation cyclique, et d'une force de cisaillement, parallèle à l'axe du vaisseau et qui naît de la friction entre le courant sanguin et la cellule endothéliale. Cette force de cisaillement hémodynamique (*shear stress*) est mesurée par la force de friction exercée sur l'unité de surface. Elle est directement proportionnelle avec la viscosité du sang et inversement proportionnelle avec le diamètre des vaisseaux sanguins ayant des valeurs de 1-6 dynes/cm² dans le système veineux, et de 10-70 dynes/cm² dans le système artériel (*Benson, Nerem, et Pedley, 1980; Davies et al., 1995; Malek et al., 1999*).

C.2.3.1. Les facteurs de vasodilatation: Suite à la stimulation par l'acétylcholine ou par la bradykinine, les cellules endothéliales sécrètent plusieurs catégories des molécules vasodilatatrices. Parmi celles-ci le plus important est l'oxyde nitrique (NO) qui est synthétisé dans la cellule endothéliale par une réaction catalysée par l'enzyme eNOS (*Jaffe, 1987; Radomski, Palmer et Moncada, 1987; Palmer, Ferrige et Moncada, 1987*). Initialement nommé facteur de relaxation dérivé de l'endothélium (EDRF -*endothelium derived relaxing factor*) ce radical libre, une fois généré, peut diffuser vers les cellules musculaires lisses et activer la guanylate cyclase, une enzyme produisant de la guanosine monophosphate cyclique (cGMP) (*Fleming et Busse, 1999*). Ce messager secondaire est capable d'induire dans les cellules musculaires vasculaires un état de «relaxation active» traduit par une diminution de la sensibilité de l'appareil contractile au Ca²⁺ (*Carvajal et al., 2000*).

L'endothélium produit aussi la prostacycline (PGI₂), un autre vasodilatateur important qui active dans les cellules musculaires lisses, l'adénylate cyclase et augmente la concentration de cAMP (adénosine monophosphate cyclique) avec le même effet que la

cGMP (guanidine monophosphate cyclique). La prostacycline est un vasodilatateur d'une courte demi-vie, actif dans tous les lits vasculaires (*FitzGerald, 1981*).

Le facteur d'hyperpolarisation dérivé de l'endothélium (EDHF) représente un régulateur important du tonus et de la réactivité vasculaire. Particulièrement actif dans les petits vaisseaux, il produit l'hyperpolarisation de la membrane plasmique de la cellule musculaire lisse, ce qui réduit l'activité des canaux de calcium dépendants du voltage et limite l'entrée du calcium dans les cellules (*Féléto et Vanhoutte, 2000*). Par conséquent, les cellules musculaires sont maintenues en état de relaxation.

C.2.3.2. Les facteurs de vasoconstriction: Les cellules endothéliales ne synthétisent pas uniquement des vasodilatateurs. Elles peuvent participer à une **réponse contractile** essentiellement exercée par trois molécules. L'une est l'endothéline-1, synthétisée principalement par les cellules endothéliales tandis que deux autres variantes, l'endothéline-2 et 3 sont synthétisées par les cellules rénales et celles du système nerveux. Parmi les trois isoformes, l'endothéline-1 est la plus puissante vasoconstricteur, avec un potentiel 10 fois supérieur à celui de l'angiotensine II (*Bagnall et Webb, 2000*). La stimulation des cellules musculaires lisses par l'endothéline-1 provoque une réponse contractile ainsi qu'une réponse proliférative. Il est important de remarquer que les forces de cisaillement jouent aussi un rôle primordial dans la régulation de l'expression du gène codant pour l'endothéline-1.

Dans la circulation, la molécule d'angiotensinogène (d'origine hépatique) est transformée sous l'action de la protéase rénine (origine rénale) en angiotensine I. À son

tour, l'angiotensine I perd un dipeptide sous l'action de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, localisée particulièrement à la membrane plasmique de l'endothélium pulmonaire, et devient l'angiotensine II. Ce puissant vasoconstricteur agit par le biais d'un récepteur situé à la surface des cellules musculaires lisses. Il se trouve aussi dans les reins, le cœur, le foie et le cerveau (*Wiemer et al., 1991*).

Autres facteurs de contraction dérivés de l'endothélium (EDCFs) et ayant une origine lipidique sont représentés par des prostanoïdes tels que la prostaglandine H₂ et le tromboxane A₂ qui activent des récepteurs spécifiques et induisent une vasoconstriction (*Luscher, 1990*). Les stimuli pour la production d'EDCFs sont l'hypoxie, la pression sanguine et plusieurs médiateurs neurohumoraux (*Shimokawa, 1999*).

C.2.4. La cellule endothéliale et la coagulation

À l'état normal, la cellule endothéliale a des fonctions anticoagulantes qui empêchent la formation de la thrombine, mais la cellule peut rapidement changer son état et faciliter les mécanismes de coagulation et la formation de thrombine (*Crossman et Tuddenham, 1990*).

C.2.4.1. L'activité anticoagulante: Dans une situation normale, la cellule endothéliale représente une protection efficace contre la thrombose. Elle forme une barrière entre le sang et le tissu sous-endothélial hautement thrombogène. L'endothélium a la capacité de produire localement la prostacycline (PGI₂), un puissant inhibiteur de l'agrégation des plaquettes et de leur adhérence à endothélium. La thrombine, une fois fixée à la

thrombomoduline - une protéine de surface exprimée par l'endothélium - devient capable d'activer la protéine C qui inhibe l'activité des facteurs de coagulation V et VII. La thrombine active aussi la synthèse et la libération de l'activateur du plasminogène tissulaire (tPA), qui est impliqué dans la lise de la fibrine (*Crossman et Tuddenham, 1990*).

C.2.4.2. L'activité procoagulante: La coagulation se produit en grande partie sur la surface vasculaire par l'intermédiaire d'une cascade d'activation thrombotique. La rupture vasculaire induit l'activation successive de certaines serines proprotéinases, menant par la suite à un dégagement de la thrombine et à la formation du caillot. Dans les individus en bonne santé, cette cascade est étroitement réglée pour empêcher la perte de sang et pour éviter les caillots inadéquats (*Davie, 2003*).

Les cellules endothéliales synthétisent et libèrent le facteur V de la coagulation, activent le facteur XII et expriment à leur surface des sites de liaison pour les facteurs IX et X, éléments clés de la coagulation. Les cellules endothéliales expriment aussi une glycoprotéine membranaire, le facteur tissulaire (Tf), qui est le cofacteur du facteur de coagulation VIIa. Ces deux activent ensemble la voie extrinsèque de la coagulation (*Crossman et Tuddenham, 1990*).

Un autre paramètre de qui dépend l'état de coagulation est le facteur von Willebrand (vWF). Synthétisé par l'endothélium et par les megakariocytes il est impliqué dans l'adhésion des plaquettes sanguines à la membrane basale endothéliale dénudée et conduite à la formation du thrombus (*Naruse et King, 2001*). Il est stocké dans les corpuscules Wiebel-Palade et il est sécrété à la face abluminale des cellules endothéliales lésées. Les

corpuscules de Weibel – Palade, détectables seulement en microscopie électronique, sont en petit nombre, ou même absents, au niveau des capillaires par rapport aux veines et artères, où ils abondent (*Simionescu M et Simionescu N, 1984*).

C.3. L'hyperglycémie et le transport endothélial du glucose

La glycation des protéines intracellulaires dépend de la concentration cytosolique de glucose. Comme la bicouche lipidique est imperméable aux sucres, la manière par laquelle les cellules captent les sucres nécessaires à leur métabolisme est par l'entremise des transporteurs transmembranaires. Jusqu'à date on connaît deux catégories des transporteurs pour le glucose: Na⁺ dépendants (SGLT), avec une distribution limitée aux cellules épithéliales intestinales (*Kimmich, Carter-Su et Randles, 1977*) et Na⁺ indépendantes (GLUTs).

Les transporteurs GLUTs facilitent le transport du glucose de la circulation sanguine jusqu'au tissus cibles (principalement les cellules musculaires et le tissu adipeux) suivant son gradient (*Kahn et al., 1992*). Actuellement, cinq isoformes sont connues : les GLUT₁₋₄ et le GLUT₅, un transporteur de fructose.

GLUT₁ est exprimé dans les érythrocytes et dans les cellules endothéliales (*Kraegen et al., 1993*). Des études effectuées sur les glomérules rénaux suggèrent que la surexpression de GLUT₁ soit impliquée dans les événements pathologiques de la néphropathie diabétique (*Moutzuris et al., 2007*). Ceci pourrait donc être une explication

possible pour l'augmentation du taux du glucose intracellulaire dans l'endothélium des personnes hyperglycémiques.

GLUT₂ est un transporteur du glucose présent dans les cellules du foie, de l'intestin, du rein, et dans les cellules bêta du pancréas. Il fonctionne en tant qu'élément sensible au glucose dans les cellules bêta du pancréas et dans le transport basolatéral des cellules épithéliales intestinales qui absorbent le glucose ingéré avec la nourriture.

GLUT₃ est exprimé principalement dans des neurones et, ensemble, GLUT₁ et GLUT₃ permettent au glucose de franchir la barrière hémato-encéphalique et entrer dans les neurones.

GLUT₄ est le transporteur sensible à l'insuline présent dans le muscle strié et dans le tissu adipeux. Contrairement aux autres isoformes de GLUT qui sont principalement localisées à surface des cellules, les protéines du transporteur GLUT₄ sont séquestrées dans des vésicules spécialisées de stockage qui, en condition normale, restent à l'intérieur des cellules. Quand le niveau postprandial de glucose monte, l'augmentation de l'insuline dans la circulation, active des cascades de signalisation qui ont comme conséquence la translocation de GLUT₄ à la membrane plasmique. Ce processus est réversible et sensible à la diminution d'insuline en circulation. Les transporteurs GLUT₄ sont enlevés de la membrane plasmique par endocytose et sont réutilisés. Sur le sujet de la translocation de GLUT₄ dans la membrane plasmique différents auteurs suggèrent deux voies distinctes : une dépendante de l'insuline et une autre activée pendant l'ischémie (*Davey, et al., 2007*).

C.4. Dysfonctions endothéliales dans le diabète

Les fonctions des cellules endothéliales sont multiples et implique des actions physiologiques spécifiques (vasoconstriction/vasodilatation, stimulation et inhibition de la croissance cellulaire, inflammation et hémostase), une définition exacte du dysfonctionnement endothéliale ne couvre la totalité des anomalies possibles dans leur activité normale. Les changements qui interviennent dans le fonctionnement de ces cellules, comporte en principal, une augmentation (ou une diminution) du messenger chimique correspondant avec altération de leur effet moléculaire. En même temps la cellule endothéliale affecte l'activité normale d'autres types cellulaires, comme les cellules de la circulation sanguine (les plaquettes, les leucocytes et les macrophages) ainsi que la cellule musculaire lisse, les péricytes rétinienne et les cellules mésangiales rénales.

Une hyperglycémie à long terme, conduirait à une diminution de la production des vasodilatateurs, et/ou une stimulation de la production des vasoconstricteurs (augmentation de l'endothelin-1) ainsi qu'une augmentation de la perméabilité des capillaires aux macromolécules. Des études effectuées dans notre laboratoire démontrent que dans l'endothélium capillaire alvéolaire, la densité des cavéoles et le volume partiel qu'elles occupent augmentent au cours du diabète (*Pascariu, Bendayan et Ghitescu, 2004*), ce qui suggère une transcytose intensifiée dans les capillaires alvéolaires. Cette affirmation est soutenue par le fait que les cytokines pro-inflammatoires comme interleukine -1 et TNF- α (tumor necrosis factor-alpha) stimulent la production de NFkb (necrosis factor), un promoteur du gène de la cavéoline-1 (*Ono et al., 2004; Iwasaki et al., 2007*).

Une augmentation de la concentration des protéines circulantes glyquées, pourrait être responsable des changements dans la perméabilité glomérulaire sélective, par l'altération de la structure du filtre glomérulaire (*Londoño et Bendayan, 2001*).

De nombreuses études, ont suggéré qu'une concentration élevée de glucose modifie les fonctions des cellules mésangiales. L'expansion mésangiale liée au diabète se caractérise par une hypercellularité, un épaissement des membranes basales et de la matrice extracellulaire (*Mauer et al., 1984; Bendayan et al., 1986*). En 1992, Wolf et al., ont démontré que la croissance des cellules mésangiales exposées à de fortes concentrations de glucose comporte une réponse biphasique: leur division est stimulée dans un premier temps, mais après la phase initiale de prolifération, les cellules entrent dans une phase d'hypertrophie avec une augmentation de la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire.

Au cours du diabète un état pro-inflammatoire s'installe (*Williams et Nadler, 2007*). Dans la microvascularisation pulmonaire, cet état est caractérisé par une expression différente des molécules d'adhésion endothéliale. Deux types d'altération sont notées: des molécules d'adhésion dont l'expression augmente avec l'hyperglycémie (ICAM-1, VCAM-1, P-sélectine) et d'autres qui diminuent (CD34, PECAM-1, CEACAM et les intégrines α V et β 5). Ceci expliquerait peut être, l'intervention spatio-temporelle différente de ces molécules d'adhésion dans la migration transendothéliale des leucocytes. Ces résultats appartiennent à notre laboratoire (non publiés), et sont en accord avec d'autres données de la littérature indiquant que l'inflammation prend des facettes moléculaires et cellulaires spécifiques au tissu et au type d'inflammation (*Muller et al., 2002*).

Le diabète est un état d'hypercoagulabilité (*Stegenga et al., 2006*). Une possible explication résiderait dans la glycation de l'annexine II (*Ghitescu, Gugliucci et Dumas, 2001*) - un récepteur pour l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) et pour le plasminogène. Une telle interaction amène le précurseur de l'enzyme de la fibrinolyse à proximité de son activateur et favorise le clivage du plasminogène en plasmine active. Il est supposé que la glycation du récepteur (annexine II) diminuerait la capacité de celui-ci d'amener en contact le tPA et le plasminogène, avec une réduction subséquente de la formation de la plasmine et donc une diminution de la capacité fibrinolytique du système (*Gugliucci et Ghitescu, 2002*).

D. LA DEGLYCATION DES PROTÉINES

La conviction générale était que la seule macromolécule pour laquelle les cellules possèdent des mécanismes de réparation serait l'ADN. On considère que les autres macromolécules, particulièrement les protéines, une fois endommagées, sont détruites et remplacées par la synthèse *de novo*. Pourtant, quelques hypothèses portant sur de possibles mécanismes de réparation des protéines ont été récemment avancées. L'une d'entre elles concerne un système de «contrôle de qualité» déployé dans le réticulum endoplasmique et qui détecte, au cours des étapes précoces de la glycosylation enzymatique, les imperfections de structure secondaire de la protéine et recycle l'entière chaîne polypeptidique sans la dégrader (*Chevet et al., 2001*). Une deuxième hypothèse concerne le thème de ce mémoire et porte sur une stratégie développée par les cellules pour se défendre contre les effets délétères de l'hyperglycémie et de la subséquente glycation des protéines. En tant que modification posttraductionnelle, le processus de glycation sera confronté, dans le milieu intracellulaire, par deux mécanismes distincts de deglycation (pour l'instant hypothétiques) qui empêcheraient la formation ou l'accumulation des produits de condensation sucre-protéines.

D.1. La transglycation

La transglycation est un nouveau concept qui suggère que les hydrates de carbone attachés aux protéines au cours du processus de glycation (fructosyllysine ou autres) peuvent être transférés, sans l'intervention d'enzymes, vers une catégorie de nucléophiles

intracellulaires comprenant les acides aminés libres et des peptides tels le glutathion, la carnosine et l'ansérine. Ce transfert amènerait la protéine glyquée à son état initial (Fig.4).

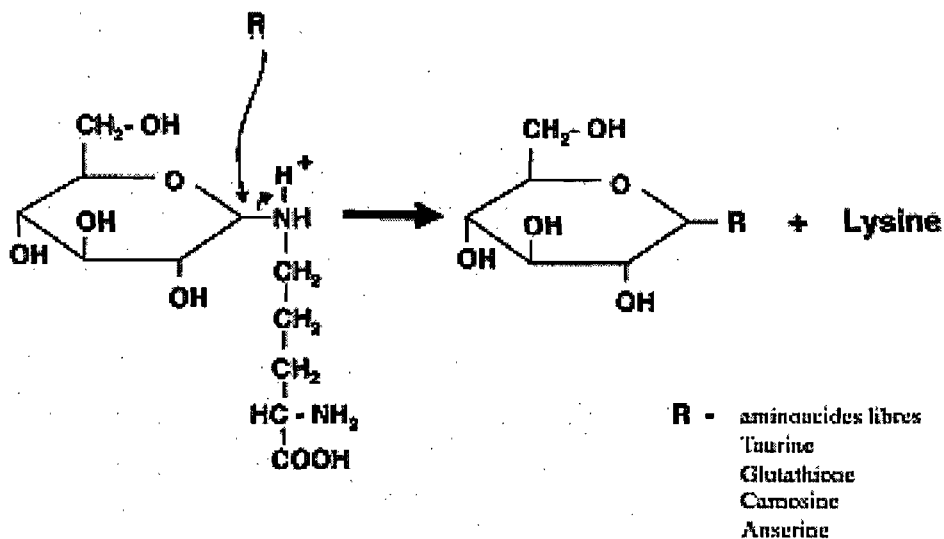


Figure 4: Le processus de transglycation sans intervention enzymatique (*Image modifiée après Szwegold, Howell et Beisswenger, Diabetes, 2001*).

L'hypothèse présume que la cellule se débarrasse par la suite des acides aminés glyqués ainsi formés par l'entremise des transporteurs de la membrane plasmique tels que la protéine de la résistance pléiotrope (multidrug resistance protein). Cette spéculation est soutenue par le taux élevé des sous-produits de transglycation de petite taille détectés dans le plasma et l'urine des patients diabétiques (*Szwegold, 2005*), même si, à notre avis, ceux-ci peuvent provenir de la protéolyse des protéines glyquées.

Le postulat du mécanisme de transglycation est particulièrement intéressant puisqu'il offre une stratégie possible d'intervention dans les complications diabétiques par des

approches diététiques ou pharmacologiques. Plusieurs accepteurs de la partie glucidique des protéines glyquées ont été étudiés, *in vitro* et *in vivo*.

D.1.1. Le glutathion

Le glutathion (GSH) est un tripeptide formé d'acide glutamique, de cystéine et de glycine, présent dans le cytosol et les mitochondries des cellules de mammifères (*Meister, 1983*). Le GSH est principalement synthétisé dans le foie et ensuite transporté aux tissus périphériques (*Powers et Lennon, 1999; Coleman, 2000*). Grâce à sa capacité de transporteur d'hydrogène il est un puissant antioxydant (*Ji et al., 1998*). La glutathion peroxydase (GSX) est une enzyme essentielle particulièrement dans le muscle squelettique, où, suite à l'effort physique, apparaît un important stress oxydatif et de peroxydation lipidique (*Powers et Lennon, 1999; Coleman, 2000*). La capacité réductrice globale de GSH diminue avec la présence des AGEs dans les cellules humaines de neuroblastome (*Deuther-Conrad et al., 2001*). Dans la même direction, la quantité d'hémoglobine glyquée augmente dans les cas de déficit de GSH et de glucose-6-phosphate déshydrogénase (*Jain, 1998*). Le GSH peut empêcher la glycation des protéines du cristallin (*Ajiboye et al., 1989*) et il a été prouvé de renverser l'effet de la glycation précoce sur la myosine. (Étude *in vitro* sur la motilité des fibres des myosines – *Ramamurthy, Jones et Larsson, 2003*).

D.1.2. La pyridoxamine

La pyridoxamine est une des trois formes naturelles de la vitamine B6 et, en fait, un dérivé aminé de la pyridine. Les trois formes peuvent être transformées en pyridoxal

phosphate, la forme réellement active de la vitamine B6 (*Sakurai et al., 1992*). Les effets du pyridoxamine au cours du diabète sont multiples et sont liés à la prévention de la formation des produits de glycation avancée (*Booth et al., 1997*) et des dommages au niveau de mitochondries (*Rogers, Higgins et Kline, 1986*). La pyridoxamine empêche aussi la peroxydation des lipides (*Nakamura, Kawakami et Yoshihiro, 2002*), corrige la dyslipidémie dans les rats diabétiques et protège contre le développement des complications microvasculaires dans la rétinopathie et la neuropathie (*Degenhardt, Alderson et Arrington, 2002*). Le mécanisme par lequel la pyridoxamine empêche la formation des PTAG est encore non confirmé mais il semble que la pyridoxamine réagit avec des intermédiaires dicarbonylés pendant la formation des PTAG. Des expériences ont prouvé que la pyridoxamine empêche la formation des PTAG à partir de méthyleglyoxal *in vitro* et *in vivo* (*Nagaraj et al., 2002*).

D.1.3. La carnosine

La carnosine est un dipeptide naturel (β -alanyl-L-histidine) trouvé dans le cerveau, le cristallin, les muscles, en concentrations de jusqu'à 20 mM chez l'homme. Elle est considérée comme un agent de déglycation naturelle. La carnosine a beaucoup de fonctions: de neurotransmetteur, d'immunomodulateur, de chélateur des ions des métaux, et d'antioxydant (*Boldyrev et al., 1994*) et elle peut retarder la sénescence des fibroblastes en culture (*McFarland et Holliday, 1994*). La carnosine peut réagir préférentiellement avec des aldéhydes (malondialdéhyde) et protéger les protéines contre l'attaque des sucres réducteurs (*Hipkiss et al., 1993*). Sa structure est semblable aux séquences préférées de glycation dans les protéines (lysine-histidine).

D.1.4. La taurine

La taurine ou l'acide 2-aminoethanesulfonique est un dérivé de la cystéine, présente en concentrations millimolaires dans le plasma, les cellules et le liquide interstitiel (Cuisinier, De Welle et Verbeeck, 2002). Parmi ses diverses fonctions physiologiques (Huxtable, 1992), la taurine possède une action antidiabétique (Goodman et Shibabi 1990); grâce à sa capacité antioxydante, elle protège les cellules contre les dommages des radicaux libres (Banks et al., 1992). Un taux réduit de taurine a été trouvé dans les patients avec une rétinopathie diabétique. L'administration orale de taurine empêche l'agrégation des plaquettes (Franconi, Bennardini et Mattama, 1995) et la formation des caillots dans la rétinopathie diabétique (Di Leo, Santini et Cercone, 2002). D'autres études cliniques avec la taurine ont été effectuées sur des patients avec neuropathie (Obrosova, Fathallah et Stevens, 2001) et néphropathie diabétique (Trachtman, Del Pizzo et Futterweit, 1992). Les mécanismes moléculaires de l'action de la taurine sont peu connus, mais des études montrent que la taurine peut conduire à une diminution de la production de ROS par une réduction du niveau d'autooxydation du glucose (Nandhini et Anuradha, 2003). Ces actions polyvalentes fournissent une raison suffisante pour considérer la taurine comme supplément potentiellement utile aux diabétiques.

D.2. La deglycation enzymatique par la fructosamine-3 kinase

La découverte, il y a 15 ans, dans le cristallin et les érythrocytes des animaux diabétiques d'un dérivé inhabituel d'hexose- le fructose-3- phosphate (Petersen et al., 1990; Szwegold, Kappel et Brown, 1993), a conduit à l'identification de l'enzyme

responsable de sa formation – la fructose-3- phosphokinase (*Lal et al., 1993*). L'enzyme, clonée et caractérisée, a pris donc le nom de fructosamine-3-kinase (FN3K) (*Szwegold et al., 2001*). L'ajout enzymatique d'un groupe phosphate dans la proximité du carbonyle (Fig. 5) a des conséquences négatives sur la stabilité du produit Amadori. Ainsi, la fructosyl-3 phosphate-lysine (FL3P) se décompose spontanément, en libérant un phosphate inorganique, le sucre en tant que 3-déoxyglucosone et la protéine déglyquée.

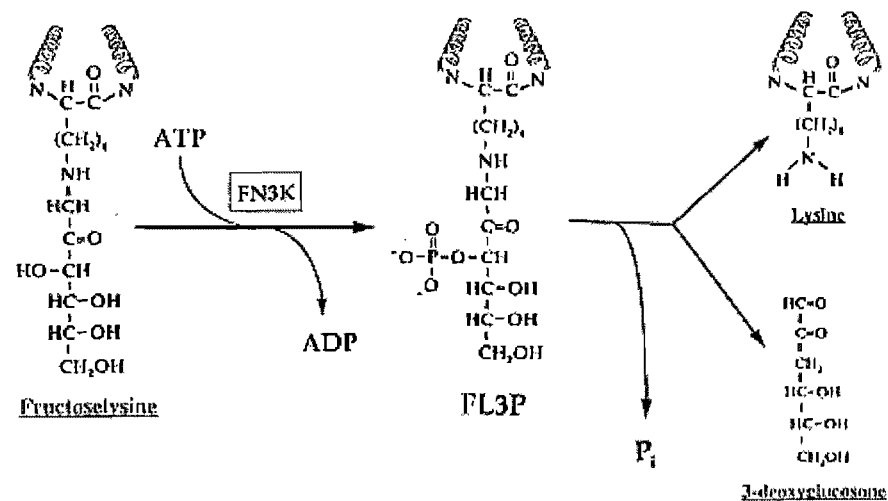


Figure 5: Le rôle catalytique de la FN3K dans la décomposition du fructoselysine (FL). La phosphorylation de FL en fructoselysine-3-phosphate (FL3P) est suivie de la formation de lysine, de 3-deoxyglucosone (3DG) et de phosphate anorganique (Pi) (*Szwegold, 2001*).

La preuve que la FN3K est responsable de la déglycation des protéines a été fournie la première fois par Delpierre qui a montré que la quantité de FN3K baisse dans les érythrocytes incubées avec glucose (*Delpierre et al., 2002; Delpierre et Van Schaftingen, 2003*). Les résultats récents obtenus chez les souris FN3K^{-/-} comparées aux souris de type sauvage démontrent une augmentation de 10 fois de la fructoselysine sous sa forme libre

dans les érythrocytes, le cerveau et le coeur, de 4 fois dans le foie et les muscles squelettiques, mais pas dans le sérum et le rein.

L'étude sur les fibroblastes en culture soumis aux conditions qu'imitent les effets du diabète (hyperglycémie, hyperinsulinémie, activation d'interleukin-1 β , et de NF κ B) montre que l'ARN messager de la FN3K reste inchangé (*Szwegold, 2004*). D'autres études montrent que la FN3K agit seulement dans le milieu intracellulaire et qu'elle ne peut pas protéger les protéines extracellulaires contre l'effet de la glycation. (*Veiga da-Cunha et al., 2006*).

E. MATÉRIEL ET MÉTHODES

La stratégie de l'approche expérimentale

Au coeur de la partie expérimentale de ce projet se situe une méthode qui permet d'identifier les protéines qui portent des produits précoces de glycation, du genre glucitollysine. Cette méthode comporte la séparation des protéines par électrophorèse et la détection des espèces glyquées avec des anticorps dirigés contre les épitopes spécifiques aux produits précoces de glycation.

Dans une première étape nous avons tenté de reconnaître les organes préférentiellement ciblés par le processus de glycation chez le rat diabétique. Ceci a été fait par l'analyse densimétrique comparative de l'intensité du signal immunochimique obtenu par l'immunobuvardage de l'ensemble des protéines provenant de différents organes. On pense qu'au cours de l'hyperglycémie chronique, propre au diabète, l'augmentation de la concentration intracellulaire de glucose entraînerait une intensification de la glycolyse, avec une hausse correspondante du taux de glucose-6-phosphate, un agent glycant plus puissant que le glucose. Par conséquent, notre étude a utilisé des anticorps capables de différencier entre la glucitollysine et la glucitol-6-phosphate lysine (G6P), dans le but de voir si ces deux sucres ont des contributions spécifiques dans la glycation de différents tissus. Les mêmes espèces protéiques sont ciblées par le glucose et G6P, mais la nature de ces protéines est spécifique à l'organe. Le glucose représente l'agent de glycation dominant. De manière surprenante, nous avons trouvé que, par rapport à la quantité totale de protéines, le poumon du rat diabétique contient des quantités de glucitollysine et G6P-lysine comparables aux celles détectées dans le plasma sanguin. Le cœur le muscle squelettique et

le foie, organes munis de riches lits vasculaires sont aussi intensément glyqués. Ces résultats suggèrent une corrélation entre le niveau de glycation d'un tissu et l'étendue de son réseau vasculaire et confirme notre hypothèse qu'au cours du diabète, les protéines des cellules endothéliales représentent une cible préférentielle de glycation.

Vue la proportion importante de capillaires dans le parenchyme pulmonaire, nous avons isolé les cellules endothéliales de la vascularisation pulmonaire par une technique originale qui utilise l'immunosélection des cellules par des billes magnétiques recouvertes d'anticorps contre l'enzyme de conversion de l'angiotensine, protéine abondante à la surface de l'endothélium du poumon. Pour identifier les protéines endothéliales les plus fortement glyquées, nous avons combiné la séparation électrophorétique en deux dimensions, l'immunobuvardage avec les anticorps antiglycitolysine et l'analyse par spectrométrie de masse des protéines reconnues par ces anticorps.

Nous avons essayé de reproduire le système de glycation *in vivo*, dans un modèle de cellules endothéliales en culture. La justification se base sur le fait que la glycation devrait dépendre seulement du taux de glucose et de la durée de vie des protéines intracellulaires (heures jusqu'à quelques jours, selon la littérature). Pourtant, le résultat de cette tentative a démontré que le modèle animal, *in vivo* est, dans ce cas, irremplaçable.

Finalement, nous avons voulu vérifier, dans un modèle de glycation *in vitro*, si certains agents anti-glycants, connus pour prévenir ou diminuer la formation des PTAG sont également capables d'interférer avec l'étape première du processus de glycation : l'attachement covalent de sucres réducteurs aux protéines.

Modèle animal. L'étude a été faite sur dix rats males, Sprague Dawley, rendus diabétiques par l'injection unique, intrapéritonéale (i.p.) de streptozotocine (STZ), 70 mg/kg. Les animaux ont été maintenus hyperglycémiques pour une année. Pour chaque animal la glycémie a été mesurée à 48 heures après l'injection de STZ et juste avant le sacrifice, en utilisant le kit de GlycoTest II et la glycosurie a été surveillée de manière hebdomadaire, en utilisant des bandelettes Uriscan. Un nombre égal d'animaux normaux a été inclus dans le protocole expérimental en tant que contrôle. Les animaux ont eu libre accès au régime de diète standard et à l'eau. Toutes les expériences ont été entreprises avec l'approbation du Comité institutionnel de la déontologie pour l'expérimentation sur des animaux.

Culture de cellules endothéliales. L'étude *in vitro* sur la glycation des protéines endothéliales a été réalisée sur de cellules endothéliales immortalisées de la lignée RBE₄. Ces cellules proviennent de la microvascularisation de cerveau de rat (*Durieu-Trautmann et al., 1993, Roux et al., 1984, 1989*), et elles ont été utilisées entre les passages 37 et 41. Le milieu de culture α -MEM /Ham F10 (1:1) a été supplémenté avec 10% sérum fœtal de veau inactivé (30 min à 60⁰C), 2mM L-glutamine, 0.3 mg/mL généticine, 0.05 mg/mL gentamicine. Pour ralentir la vitesse de croissance et le renouvellement des cellules, le facteur basique de croissance des fibroblastes (bFGF), habituellement utilisé dans la culture de ces cellules, a été omis. 2×10^8 cellules ont été transférées dans des plaques Pétri de 10 cm de diamètre, recouvertes de collagène et cultivées dans une atmosphère de 95% air et 5% CO₂. Dans ces conditions la confluence est atteinte dans 7 jours. Pour détacher les cellules de la plaque, elles ont été soumises pour 10 min à 37⁰C à une solution de 0.25% trypsine dans α -MEM, sans sérum. Pour reproduire les conditions hyperglycémiques d'*in vivo*, les cellules endothéliales ont été cultivées pour des périodes allant jusqu'à 12 jours

dans un milieu contenant 30 mM D-glucose et leur niveau de glycation comparé à celui des cellules identiques exposées au milieu normal (5 mM glucose).

Évaluation de la concentration des protéines. Pour un contrôle exact de la quantité des protéines utilisées on a mesuré leur concentration par la méthode «amidonoire», dans les échantillons préalablement solubilisés en 1%SDS, bouillis et microcentrifugés (*Schaffer et Weissmann, 1973*).

Électrophorèse unidimensionnelle. L'électrophorèse a été faite sur un système Mini-Protean[®] II (BioRad Laboratoires). Les échantillons ont été solubilisés en tampon Laemmli (*Laemmli UK, 1970*), bouillis pendant 5 min et microcentrifugés pendant 10 min à 12 000 rpm. Les surnageants ont été chargés sur des gels de 10% polyacrylamide. Pour visualiser le profil électrophorétique des protéines les gels ont été colorés à l'argent (*Blum et al., 1987*).

Détection des protéines glyquées par immunobuvardage. Après leur séparation par électrophorèse, les échantillons ont été transférés sur des membranes de nitrocellulose (porosité de 0,45 µm) dans un système Mini-Protean[®] II (BioRad Laboratoires), pendant la nuit, à 4°C et sous un voltage de 30 V. Les membranes ont été plongées pendant 15 min dans une solution de 50 mM borohydrure de sodium (Sigma Aldrich) et ensuite bien lavées dans un tampon Tris-saline (TBS) pH 7.2. Cette étape de réduction est importante pour la transformation irréversible des produits instables de glycation précoce en des formes stables, détectables en immunobuvardage. Le blocage des sites d'interactions non spécifiques entre la membrane et les anticorps est réalisé avec une solution de 1% lait

dégraissé en TBS pour 1h à la température ambiante. Les membranes ont été incubées avec les anticorps primaires anti-glucitollysine (1 : 2 000) ou anti-glucose-6-phosphate lysine (1 : 1 000), toute la nuit, à 4 °C. Les anticorps non liés ont été enlevés à l'aide de plusieurs lavages avec le TBS supplémenté avec 1 % Tween 20, étape suivie par une incubation d'une heure, à la température de la pièce avec l'anticorps secondaire - chèvre anti-IgG de lapin conjugué avec HRP (Jackson Laboratories). Le signal immunochimique a été mis en évidence par chimioluminescence avec Lumi-Light (Roche Diagnostics). Ce signal, numérisé, a été quantifié avec le logiciel Scion Image et son intensité a été rapportée à la quantité de protéines chargée sur le gel.

Anticorps. Les anticorps polyclonaux, de lapin, contre la glucitollysine et la glucose- 6-phosphate lysine ont été récemment préparés dans le laboratoire en utilisant comme immunogène l'hémocyanine de patelle glyquée extensivement par le glucose et le glucose-6-phosphate (*Nguyen, Pascariu et Ghitescu, 2006*). La présence d'un réducteur (cyanoborohydrure de sodium) sert à déplacer l'équilibre de la réaction vers la création des produits stables de glycation (glycation réductive) et augmente significativement le degré de substitution des résidus lysine. Ces anticorps ont été utilisés en immunobuvardage en tant que sérum non-fractionné.

Préparation d'albumine glyquée de manière non-réductive. L'albumine bovine (BSA), porteuse d'épitopes caractéristiques aux différents produits de glycation a été préparée pour servir aux tests de spécificité et de sensibilité des anticorps. La protéine (6 mg/ml) a été incubée, en conditions stériles, avec diverses quantités (rapport molaire sucre – résidus lysine = 10) de glucose, fructose, glucose- 6- phosphate or glycéraldéhyde-3-phosphate

(Gald3P) pour 3 semaines à 37 °C. Le sucre en excès a été enlevé par dialyse exhaustive contre l'eau bidistillée. La concentration de la protéine a été évaluée par spectrophotométrie ($A_{280} = 0,7$ pour 1mg/ml BSA) et le degré de la glycation par la fluorescamine (*Udenfriend et al., 1972*) qui mesure le nombre de résidus $-NH_2$ non substitué. Une série de différentes concentrations de glycine a servi à étalonner la méthode et à convertir l'intensité du signal fluorescent en mmoles NH_2 . Deux variantes de BSA, modifiées par deux épitopes caractéristiques aux AGE – carboxyméthyllysine (CML) et carboxyéthyllysine (CEL) ont également été préparées (*Nagai et al., 2000*). La quantité de sucre attaché sur chaque molécule de BSA a été calculée à partir du fait que cette molécule a 59 résidus de ϵNH_2 – lysine disponibles. Un rapport molaire de 57, 14.7, 46.6 et 8.3 de sucre/BSA a été trouvée pour BSA-glucose, BSA-fructose, BSA-G6P et respectivement BSA-Gald3P. Le degré de substitution des résidus aminée pour BSA-CML et BSA-CEL a été de 84% et 98%.

Caractérisation des anticorps: Pour évaluer la spécificité et la sensibilité des anticorps, la BSA nonglyquée a été mélangée avec chacune des variantes de BSA glyquée dans des proportions qui gardent constante la concentration en protéines totales (1 mg/ml), mais diminuant progressivement la quantité de sucre attachée de 128 à 1 nmol/mg de protéine. Des rangées parallèles des points ont été faites en absorbant sur une membrane de nitrocellulose, 1 μ l de chaque échantillon ci-dessus. Ensuite, les membranes ont été bloquées pour 1 h en 1% lait en TBS et testées séparément avec les deux anticorps décrits. L'anticorps primaire a été suivi de l'anticorps de chèvre anti IgG de lapin conjugué à la HRP (Jackson ImmunoResearch) et le signal a été détecté par chemiluminescence (kit ECL, Roche Diagnostics).

Pour montrer que nos anticorps reconnaissent seulement les formes stables de glucitollysine et glucitol-6-phosphate lysine, différentes quantités de BSA glyquée (0.5, 1.0, 2.0, 4.0 µg BSA) et réduite avec 50mM Na borohydrure (15 min à la température de la pièce) ont été migrées sur un gel de 10% polyacrylamide et transférées sur une membrane de nitrocellulose en même temps que des quantités de BSA glyquée en forme non réduite. Les bases Schiff entre le sucre et la protéine et les produits Amadori, sont des composants labiles s'ils ne sont pas réduits par Na borohydrure. Il est donc possible que ces produits se dégradent au cours de l'électrophorèse s'ils ne sont pas préalablement réduits et qu'ils échappent ainsi à la détection. Pour vérifier cette hypothèse un immunobuvardage comparatif de l'albumine glyquée avant et après l'électrophorèse (sur nitrocellulose) a été effectué.

Nous avons utilisé l'immunobuvardage en tant que méthode semiquantitative. Pour valider l'approche, différentes quantités d'homogénat de poumon de rat diabétique (1.25-25 µg protéine) ont été soumises à l'immunobuvardage avec des anticorps anti glucitollysine, suivi de l'analyse densimétrique de l'intensité du signal ECL en corrélation avec la quantité de matériel glyqué.

Immunoisolation des cellules endothéliales pulmonaires. Les cellules endothéliales de la microvascularisation pulmonaire ont été isolées en utilisant une technique originale (Fig. 6). Des billes superparamagnétiques de polystyrène de 4.5 µm diamètre conjuguées aux anticorps anti- IgM de souris (DynaL Rat anti-Mouse IgM -D₄₅₀) ont été incubées avec des anticorps monoclonaux (type IgM) anti l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) de rat. Ces anticorps (numéro d'identification 11B10) ont été antérieurement préparés, purifiés et caractérisés dans le laboratoire (*Ghitescu, Jacobson et Crine, 1999*). 0,5 mg d'anticorps

anti ACE ont été incubés pendant 12 heures à 4 °C, sous agitation lente, avec 2×10^8 billes dans 1 ml de tampon phosphate salin (TPS) pH 7.4. L'anticorps en excès a été enlevé par le lavage répété des billes (rétention des billes magnétiques). La mesure de l'absorbance du surnageant à 280 nm a permis d'évaluer à 25 µg la quantité d'IgM adsorbée sur les billes ($A_{280 \text{ nm}} = 1,2$ pour 1 mg/ml d'IgM).

Les rats anesthésiés par l'injection i.p. d'une solution de 5% chloral hydrate (0.1 ml par 100 g poids corporel) ont été perfusés avec du TPS froid via l'aorte abdominale à une pression de 110 mm Hg. Par thoracotomie, l'artère pulmonaire a été exposée, un cathéter introduit et l'oreillette gauche ouverte. Du TPS froid a été perfusé (5 ml/min) par le cathéter jusqu'à l'élimination totale du sang de la vascularisation pulmonaire, suivi de 5ml d'une suspension de billes magnétiques recouvertes d'anticorps anti ACE. Après une incubation de 15 min dans l'organe, les billes non liées ont été enlevées avec du TPS. Le même tampon a servi au lavage broncho-alvéolaire (pour écarter les macrophages alvéolaires) et le poumon a été récolté. Le tissu finement tranché a été soumis pendant 2h, avec agitation, et à 37°C à une digestion enzymatique dans 25 ml de TPS contenant 25 mg collagénase D, 2 mg élastase, 2.5 mg DNase I, 2.0 mg RNase A, 1 mM CaCl₂ et 1 mM MgCl₂. Le matériel ainsi dispersé a été dilué avec un volume égal de TPS contenant 0.25% BSA, 2mM EDTA (pour bloquer l'activité des protéases du milieu de digestion) et passé par un filtre Nytex de 100 µm. Les cellules qui portent des billes attachées (les cellules endothéliales) ont été sélectionnées à l'aide d'un aimant et le protocole de sélection répété après la dispersion des cellules dans du TPS sans BSA. Les cellules ainsi purifiées ont été divisées dans de petits échantillons et congelées à -80°C. La taille relativement grande des billes (4.5 µm) utilisées au cours du protocole antérieurement décrit soulève le problème d'accès du

traceur au réseau entier des capillaires sanguins. Pour examiner *in situ* le marquage, un échantillon de tissu pulmonaire a été récolté après la perfusion des billes est fixé dans 2.5% formaldéhyde, 1.5% glutaraldéhyde en 0.1 M tampon cacodylate pH 7.2, post-fixé en 1% OsO₄ et enrobé en Epon. Des coupes séminfines ont été colorées par bleu de toluidine et examinées en microscopie optique.

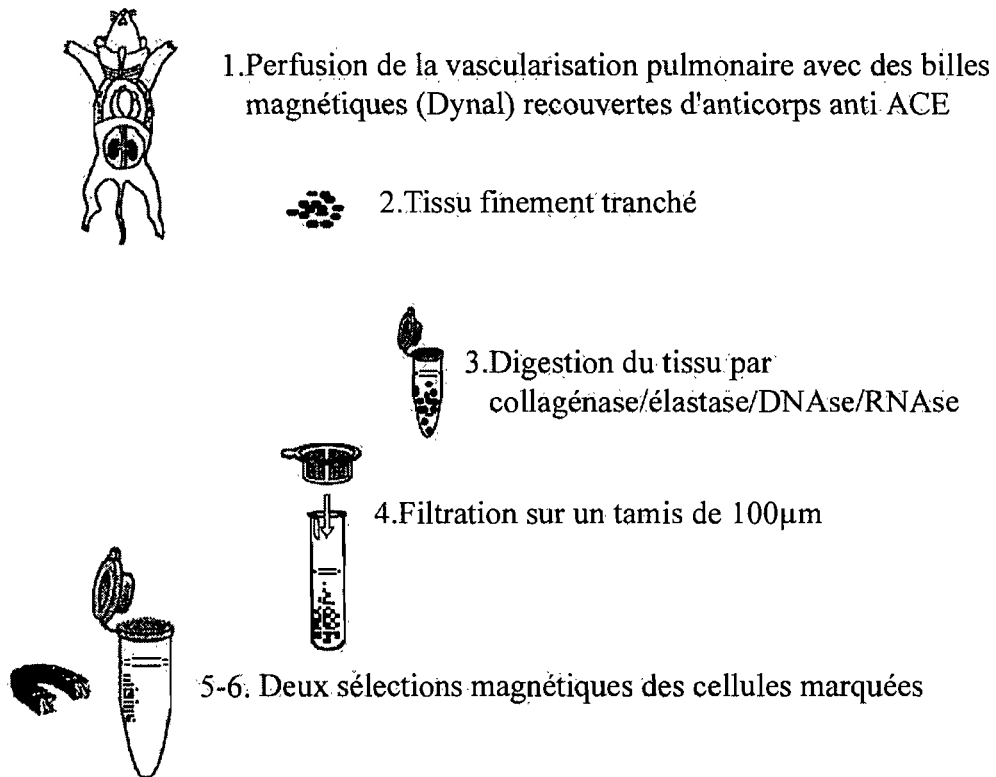


Figure 6: Immunolocalisation des cellules endothéliales pulmonaires de rat.

Validation de la nature endothéliale des cellules isolées. Deux méthodes complémentaires ont été utilisées à ce but:

a) Détection par immunobuvardage de la quantité d'ACE associée aux différentes fractions obtenues au cours de l'isolation des cellules endothéliales: Trente microgrammes de protéines de fractions suivantes 1) homogénat total du poumon, 2) homogénat du poumon soumis à la dissociation enzymatique par la collagénase, 3) les cellules immuno-sélectionnées par les anticorps anti ACE et 4) les cellules qui n'ont pas accroché les billes magnétiques ont été chargés sur un mini gel. Après le transfert sur nitrocellulose les échantillons ont été soumis à une détection de l'ACE (marqueur endothélial) par immunobuvardage selon la méthode antérieurement décrite. L'anticorps primaire (IgM, monoclonal de souris) a été utilisé à une dilution de 1:100 et l'anticorps secondaire (chèvre anti IgM de souris) à 1:5 000. Le signal ECL de chaque fraction mentionnée ci-dessus a été numérisé, évalué par densimétrie (logiciel Scion) et comparé avec ceux des autres fractions.

b) Par immunofluorescence en utilisant un anticorps contre un antigène de surface endothéliale: Un échantillon de cellules sélectionnées par notre méthode a été fixé en 1% formaldéhyde pendant la nuit, lavé 3 fois en 0,1 M tampon phosphate pH 7.4 en utilisant l'aimant pour retenir les cellules et le formaldéhyde résiduel bloqué avec 150 mM glycine (1 h à 4⁰C). Les cellules ont été incubées pendant 2 heures à froid, sous agitation lente, avec l'anticorps CD34 (une sialoglycoprotéine de surface endothéliale) dilué 1:20 dans le tampon phosphate contenant 1% albumine bovine. Cet anticorps (30B3) est un produit de notre laboratoire (*Ghitescu, Jacobson et Crine, 1999*). Un anticorps secondaire chèvre anti-

IgG de souris, conjugué à FITC (Jackson Laboratories) a été utilisé pour révéler en fluorescence les cellules CD34- positives. Comme contrôle les cellules ont été incubées seulement avec l'anticorps secondaire.

Électrophorèse bidimensionnelle. Les protéines des cellules endothéliales isolées par immunosélection ont été séparées par focalisation isoélectrique sur des languettes ayant un gradient de pH immobilisé. Nous avons remarqué que les protéines endothéliales glyquées ont majoritairement un pI dans le domaine acide, et par conséquent nous avons utilisé des languettes de focalisation isoélectrique dans le domaine de pI 4.0 – 7.0. Ceci donne également l'avantage d'une meilleure résolution des polypeptides. Pour éviter la perte de matériel soluble, cytoplasmique au cours de la préparation pour la focalisation isoélectrique, les cellules endothéliales fraîchement isolées ont été microcentrifugées à 800 g pour 5 min, le surnageant enlevé et les cellules congelées en tant que culot. La quantité nécessaire à l'analyse électrophorétique bidimensionnelle a été décongelée directement dans le tampon de migration (*Rabilloud et al., 1994*), comportant 8 M urée, 2 M thio-urée, 4 % CHAPS, 40 mM DTE, 20 mM Tris base, 0.5 % Bromophenol blue et supplémenté de 2% ampholynes pour le domaine de pH 4-7 (Amersham). Les protéines ont été solubilisées par incubation dans ce tampon pour 6 heures sous agitation forte et continue, et le matériel insoluble a été enlevé par microcentrifugation à 12 000 rpm, 10 min. Les échantillons de protéines ont été transférés par absorption, pendant la nuit, sur des languettes d'acrylamide et pH immobilisé (ImmobilineTM DryStrip, Amersham Bioscience). Pour les essais préliminaires nous avons utilisé des languettes de focalisation isoélectrique de 7 cm longueur (80 µg protéine par languette); pour les étapes préparatifs du projet, des quantités substantiellement plus élevées de protéines (400 à 800µg) ont été chargées sur des

languettes de 18 cm. La focalisation a été faite dans un système Multiphor II Pharmacia Biotechnol., selon les instructions du fabricant. A la fin de l'étape de focalisation isoélectrique, les languettes ont été incubées en dithiothréitol et iodoacétamide pour réduire et bloquer les résidus -SH des protéines et ensuite soumises à une séparation par électrophorèse en conditions dénaturante (SDS). Cette partie a été faite dans un système Minigel pour les languettes de 7 cm ou dans un système Protean II (Biorad) pour celles de 18 cm. A la fin du processus, les gels ont été colorés à l'argent (*Blum et al., 1987*) ou par Sypro Ruby (SYPRO[®] Ruby, Protein Gel Stain, BioRad) pour visualiser le profil électrophorétique général. Certains ont été transférés pour immunobuvardage avec des anticorps anti glucitolysine. Avant celui-ci, les protéines ont été mises en évidence sur les membranes NC par le colorant Sypro Ruby (SYPRO[®] Ruby, Protein Blot Stain, BioRad) pour localiser précisément les protéines marquées par l'anticorps et ensuite pouvoir les identifier dans l'image générale des protéines sur gel. Une fois la position des protéines glyquées établie sur gel par trois expériences indépendantes, les «spots» correspondants ont été excisés manuellement d'un gel de grande taille (18 cm), coloré à Sypro Ruby (SYPRO[®] Ruby, Protein Gel Stain, BioRad), récoltés en 1% acide acétique et soumis à une analyse par spectrométrie de masse.

L'analyse et l'identification des protéines par spectrométrie de masse ont été effectuées au Centre d'analyse protéomique du Génome Québec. Suite à une digestion par la trypsine, les protéines de chaque spot ont été extraites du gel et les fragments résultants analysés dans un spectromètre de masse LC-QTOF. Les données (séquences partielles d'acides aminés) ont été utilisées pour chercher l'identité de chaque peptide, par le logiciel Mascot (MatrixScience), dans les bases de données génomiques et protéiques.

L'effet des inhibiteurs de la glycation avancée sur la genèse des produits précoces de glycation. Des échantillons identiques d'albumine sérique bovine (6 mg/mL, en 0,1M tampon phosphate, pH 7.4), glyquée de manière non-réductive ont été utilisés au cours de cette expérience. Chaque molécule d'albumine glyquée a en moyen 31 de ses 57 résidus NH₂ substitués par des bases Schiff ou des produits Amadori (évaluation par la méthode de la fluorescamine, décrite auparavant). Les échantillons ont été incubés pendant une semaine à 37 °C, avec chacun des produits aminés suivants: L-lysine, L-carnosine, glutathion et pyridoxamine, dans un excès molaire de 1 000 fois par rapport à la protéine. Selon les hypothèses avancées dans la littérature, un renversement de la réaction de glycation serait possible, par le transfert de sucre (transglycation) entre la protéine glyquée (BSA) et les composants aminées (*Hipkiss, Brownson et Carrie, 2001; Voziyan, 2003*). L'immunobuvardage avec des anticorps anti-glucitollysine a été utilisé pour mettre en évidence, comparativement, la quantité de cet épitope dans tous les échantillons au moment initial (T₀) de l'incubation avec les inhibiteurs présumés et sept jours après (T₇).

F. RESULTATS

La spécificité et la sensibilité des anticorps utilisés au cours de ce travail ont été évaluées par plusieurs méthodes. De l'albumine bovine contenant différentes quantités d'épitopes caractéristiques aux produits de glycation précoces formés par plusieurs sucres : glucose, fructose, glucose-6 phosphate (G6P), glyceraldehyde-3-phosphate (Gald3P) a été adsorbée sur une membrane de nitrocellulose et testée par immunobuvardage avec les anticorps anti-glucitolysine (Fig. 7A) et anti-glucitol-6-phosphate-lysine (Fig. 7B). Sur un domaine allant de 1 à 128 pmoles de sucre lié à la protéine, la spécificité de l'anticorps pur son épitope est clairement démontrée. Ces anticorps ne reconnaissent pas deux des plus importants produits de glycation avancée – la carboxyméthyllysine et la carboxyéthyllysine. La faible réaction avec le produit de condensation entre l'albumine et le glyceraldehyde-3-phosphate résulte probablement de la haute charge négative introduite par ce triose. En tout cas, cette faible réaction croisée ne nuit pas à notre investigation car l'action glycante du glyceraldehyde-3-phosphate est nulle *in vivo*. (Nguyen, Pascariu et Ghitescu, 2006).

Les anticorps que nous avons utilisés reconnaissent les bases Schiff entre les sucres et les protéines et les produits Amadori seulement suite à leur réduction par la (cyano) borohydrure de sodium. (Fig.8). Ce résultat nous a assuré davantage du fait que les anticorps ne réagissent pas avec des composants endogènes comme les glycoprotéines, et que seulement les produits de glycation précoces générés par le glucose ou son dérivé phosphate sont reconnus.

Le traitement par la borohydrure présente également l'avantage de stabiliser chimiquement les produits labiles de glycation mais, si ce réducteur se trouve en présence simultanée des sucres et des protéines, il accélère leur condensation. Ainsi, pour éviter la formation artificielle des produits de glycation entre les sucres et les protéines présents dans l'homogénat frais des tissus ou des cellules, nous avons toujours fait le traitement à la borohydrure seulement après la séparation électrophorétique des protéines et l'enlèvement de tous les sucres à l'état libre. Pourtant, cette stratégie affronte un problème découlant de la labilité des produits de glycation non réduits: est-ce que ceux-ci résistent aux conditions thermiques de la séparation et du transfert électrophorétique? Pour répondre à cette question, deux échantillons identiques d'albumine glyquée, réduits avec NaBH_4 avant et après la migration électrophorétique ont été soumis à l'immunobuvardage (Fig.9). L'intensité du signal immunochimique est similaire pour les deux échantillons, indépendamment du moment où la réduction a pris place ce qui démontre qu'il n'y ait pas de perte ou de dégradation de matériel glyqué au cours de ce protocole expérimental. L'existence d'une relation proportionnelle entre l'intensité du signal immunochimique et la quantité des produits de glycation a été également vérifiée sur un domaine d'un ordre de magnitude (Fig.10).

L'étude comparative du niveau de glycation des protéines de différents organes a été menée sur des rats à trois mois de diabète, comparativement aux animaux normoglycémiques de même âge. La glycémie, mesurée avant le sacrifice, a été supérieure à 27 mM chez les animaux diabétiques et seulement 5-6 mM chez le lot contrôle. Dix organes et tissus ont été inclus dans cette expérience: le poumon, le coeur, le rein, le duodénum, le pancréas, le foie, le cristallin, la rétine, le muscle squelettique et le cerveau,

ainsi que les membranes d'érythrocytes et le plasma sanguin. L'immunobuvardage avec des anticorps anti-glucitolysine et anti-glucitol-6-phosphate lysine a démontré un niveau très réduit de glycation dans les organes des animaux contrôles, normoglycémiques. Pourtant, au cours du diabète, le niveau de glycation des protéines augmente de manière importante (Fig. 11). Le spectre de protéines glyquées par le glucose et par le glucose-6-phosphate est identique dans chacun des organes examinés (Fig. 11B et C), mais des différences qualitatives frappantes sont enregistrées d'un tissu à l'autre. L'évaluation densitométrique de l'intensité du signal immunochimique, rapportée à la quantité de protéines (évaluée par l'intensité de coloration en Ponceau préalable à l'immunobuvardage) met bien en évidence les différences quantitatives. Les protéines de certains organes et tissus sont particulièrement ciblées par le processus de glycation: le plasma sanguin, le poumon, le foie, le cœur, le cristallin, le rein et les érythrocytes (Fig.12). La glycation des protéines tissulaires par chacun des deux sucres (glucose et G6P) augmente de manière similaire dans la plupart des organes analysés (Fig. 13), à l'exception du cœur et du cristallin où la glycation par le G6P semble relativement plus importante. Par contre, dans le muscle squelettique, le rein et la rétine, l'augmentation du niveau de glycation par le glucose est plus dramatique que celle due au G6P. Il est évident, de ce tableau, qu'au cours du diabète les protéines de certains organes sont ciblées plus intensément que celles des érythrocytes et du plasma sanguin – les standards utilisés couramment en clinique pour évaluer l'évolution de la maladie (Fig.13). Une hausse du niveau de glycation par rapport au normal d'environ 16 fois est enregistrée pour les protéines du rein, de 10-12 fois pour le muscle cardiaque et squelettique, et 8-9 fois pour le foie et le poumon des animaux diabétiques.

La technique employée pour isoler les cellules endothéliales de la microvascularisation pulmonaire diffère des celles utilisées dans d'autres laboratoires par le fait que le marquage de la surface endothéliale avec les anticorps immobilisés sur de billes magnétiques se fait avant la digestion enzymatique du tissu et non après. L'idée était qu'une fois liée à son antigène de surface, la bille magnétique va le protéger contre les protéases non spécifiques qui contaminent la collagénase. Une inspection du tissu perfusé avec les billes indique que celles-ci ont pénétré dans un grand nombre de capillaires pulmonaires et ont été retenues à la surface endothéliale (Fig. 14). La sélection magnétique, très facile et très efficace des cellules marquées par ces billes conduit à une population de cellules de taille relativement petite (environ 10-12 μm de diamètre). Une proportion importante de ces cellules se trouve sous forme d'agrégats, en dépit de la présence de l'EDTA dans le tampon de dispersion. Le comptage étant donc impossible, nous avons évalué l'efficacité du processus d'isolation par le contenu en protéines: 1.0 – 1.2 mg de protéine dans la fraction cellulaire finale, par rapport à 2.80- 3.60 mg dans le matériel de départ (l'homogénat total de poumon). Le marquage par immunofluorescence avec un anticorps (30B3) contre une protéine intégrale de la membrane plasmique endothéliale – la CD34 – démontre que la vaste majorité (minimum 95%) des cellules ainsi isolées répondent de manière positive à ce test (Fig.15). La spécificité du marquage a été prouvée par le manque de signal en absence d'anticorps primaire (Fig. 15, en bas). L'évaluation quantitative par immunobuvardage et densimétrie de la distribution de l'ACE dans les différentes fractions récupérées au cours de l'isolation des cellules endothéliales démontre un fort enrichissement en cette enzyme de surface endothéliale dans la fraction finale (Fig.16). Les cellules endothéliales isolées contiennent par mg de protéine environ 6 fois plus d'ACE que l'homogénat pulmonaire total. Remarquable est le fort appauvrissement en

ACE des cellules qui n'ont pas liées les billes magnétiques et qui n'ont pas été sélectionnées.

Les profils électrophorétiques des protéines totales (Fig. 17), ainsi que ceux des protéines glyquées (Fig. 18) diffèrent substantiellement entre les cellules endothéliales et le poumon entier, ou les cellules non sélectionnées. Une évaluation densimétrique du niveau de glycation montre que, par mg de protéine, les cellules endothéliales pulmonaires contiennent environ 2.5 fois plus d'épitopes glucitolysine que l'homogénat de poumon (Fig. 18B). Ce résultat démontre que la cellule endothéliale subit un processus de glycation beaucoup plus intense que l'organe entier.

Des expériences préliminaires ont indiqué que la plupart des protéines glyquées de l'homogénat pulmonaire provenant des animaux diabétiques sont localisées dans le domaine de pI légèrement acide (de 4.0 à 7.0) (données non montrées). Par conséquent, nous avons séparé les protéines endothéliales par électrophorèse bidimensionnelle en utilisant pour l'étape de focalisation isoélectrique des bandelettes de pH immobilisé dans ce domaine.

L'identification des protéines endothéliales glyquées a été faite en comparant le schéma global de protéines étalées et colorées sur gel et sur membrane de nitrocellulose avec celui obtenu par l'immunobuvardage avec des anticorps anti glucitolysine. Pour contrôler la spécificité du marquage immunochimique, deux échantillons des protéines d'homogénat pulmonaire, l'un provenant d'un animal diabétique et l'autre d'un rat normoglycémique ont été inclus dans la deuxième étape de séparation, par SDS-PAGE

(Fig. 19A, les deux bandes latérales). La réaction immunochimique démontre l'absence de signal dans l'échantillon non glyqué (Fig. 19B, à droite), contrairement à une réponse forte intense pour l'échantillon provenant de l'animal diabétique (Fig.19B, bande à gauche). Le fait que l'immunobuvardage a été exécuté sur la même membrane de nitrocellulose, préalablement coloré par Sypro Ruby, a permis un alignement parfait de l'image dévoilant la position des protéines glyquées (Fig. 19B) avec celle des protéines totales (Fig. 19A). Ces positions ont été ensuite transposées, sans difficulté, sur l'image des protéines endothéliales étalées sur un gel similaire, mais de grandes dimensions (18 cm) et coloré par Sypro Ruby (Fig. 20).

Il est évident que seulement une proportion réduite des polypeptides appartenant à la fraction de cellules endothéliales pulmonaires est glyquée et que celle-ci ne représente pas les protéines les plus abondantes (Fig. 20). Nous avons pu identifier 54 spots représentant des polypeptides glyqués et seulement vingt de ceux-ci ont été choisis et récoltés pour l'analyse par spectrométrie de masse. Le critère appliqué pour cette sélection a été celui de la quantité de protéine trouvée dans chaque spot et l'intensité du signal immunocytochimique obtenus avec les anticorps antiglycitolysine. Les données de spectrométrie de masse ont permis d'identifier 15 protéines individuelles, incluant quelques isoformes (Tableau I). Deux de celles-ci sont des protéines de la matrice extracellulaire: la laminine et le collagène type VI, probablement en tant que vestiges de la membrane basale incomplètement digérée par la collagénase. Trois autres polypeptides appartiennent à la catégorie des protéines de cytosquelette: l'actine bêta, trois isoformes de la sous unité bêta

de la tubuline et la tropomyosine, tandis qu'un groupe de quatre chaperonnes, résidentes du réticulum endoplasmique représente des éléments importants du mécanisme de maturation des (glyco) protéines.

La tentative de vérifier l'hypothèse selon laquelle un mécanisme d'inhibition de la formation de produits PTAG par des substances aminées impliquerait un processus de transfert de sucres (transglycation) entre les produits de glycation précoce (bases Schiff et produits Amadori) et les résidus aminés de ces inhibiteurs, a donné un résultat négatif. Sept jours d'incubation de l'albumine glyquée (de manière non réductive par le glucose) avec un panneau d'inhibiteurs PTAG (L-lysine, glutathion, L-carnosine et pyridoxamine) n'ont pas réussi à réduire, de manière visible, la quantité de glucitollysine liée à la protéine (Fig. 21).

L'essai de définir un modèle de glycation des cellules endothéliales *en culture* a été également infructueux. Les cellules endothéliales immortalisées RBE4 de microvascularisation cérébrale de rat, maintenues pendant 12 jours dans un milieu hyperglycémique (30 mM glucose) ralentissent sensiblement leur vitesse de multiplication mais leurs protéines restent très peu glyquées, comparativement à la situation des tissus fraîchement récoltés d'un animal diabétique (Fig. 22).

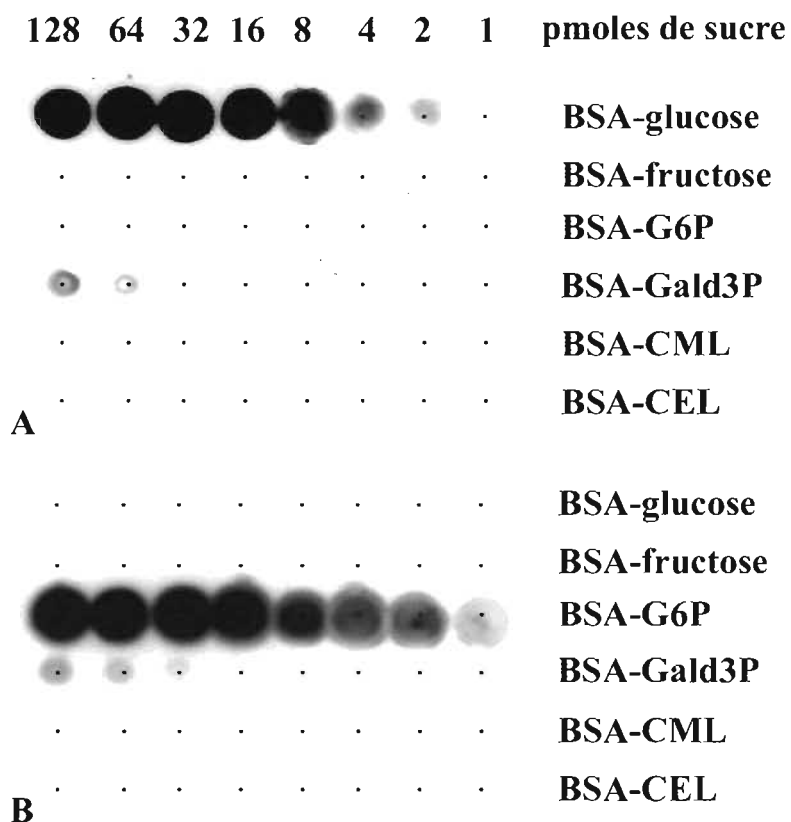


Figure 7 : Caractérisation du système de détection des protéines glyquées : Les anticorps anti-glucitolysine (A) et anti-glucitol-6-phosphate-lysine (B) reconnaissent uniquement leurs épitopes spécifiques. Test de spécificité, par immunobuvardage, contre des :

- produits précoce de glycation : BSA-glucose
 - BSA-fructose
 - BSA-glucose-6-phosphate (G6P)
 - BSA-glyceraldehyde-3-phosphate (Gald3P)
- produits terminaux de glycation : BSA-carboxymethyllysine (CML)
 - BSA-carboxyethyllysine (CEL)

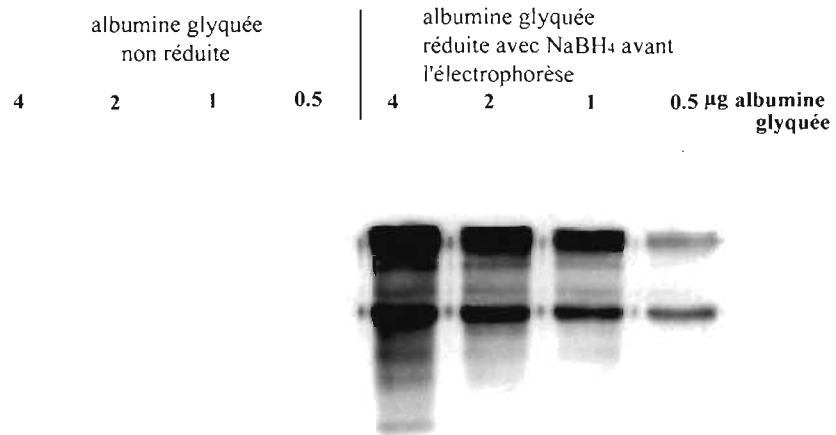


Figure 8 : Les anticorps ne reconnaissent que le produit de glycation réduit par NaBH₄ (à droite). Immunobuvardage avec des anticorps anti-glycitolysine.

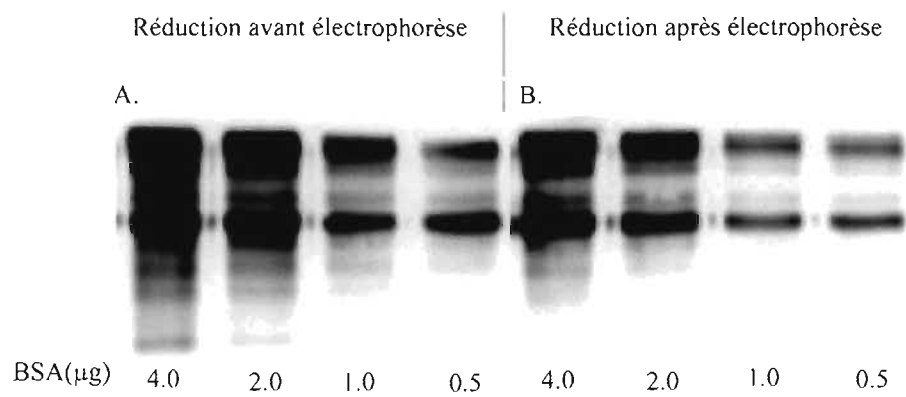


Figure 9 : Quantités différentes d'albumine glyquées ont été réduits avec NaBH_4 avant (A), et après l'électrophorèse (B). L'électrophorèse n'entraîne pas de dégradation des produits de glycation non-réduits.

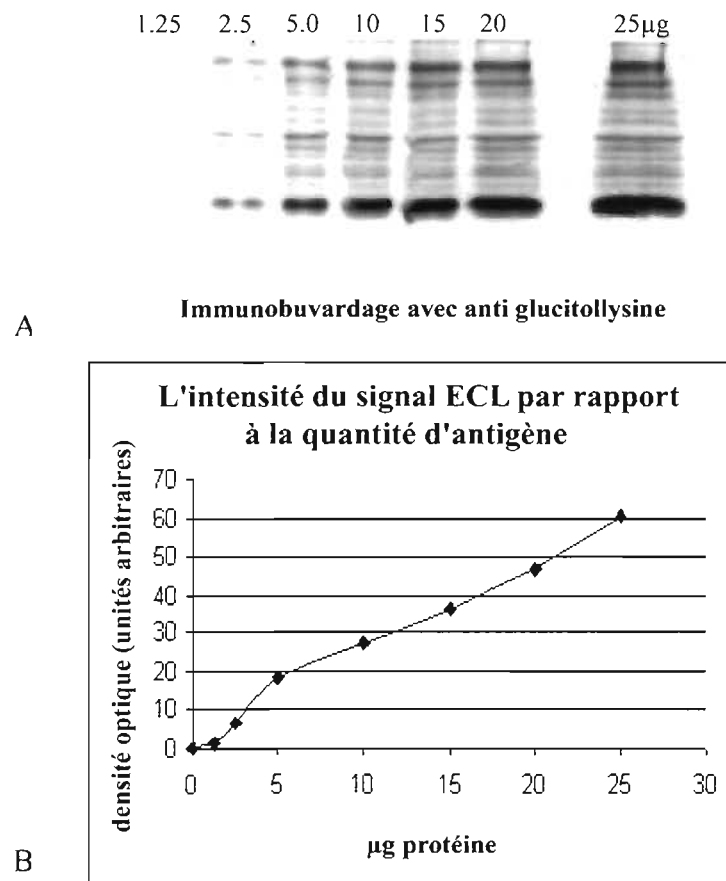


Figure 10 : Homogénats de poumon de rat diabétique. Immunobuvardage avec des anticorps anti-glucitollysine (a). L'intensité du signal immunochimique (ECL) est proportionnelle à la quantité des produits glyqués (b).

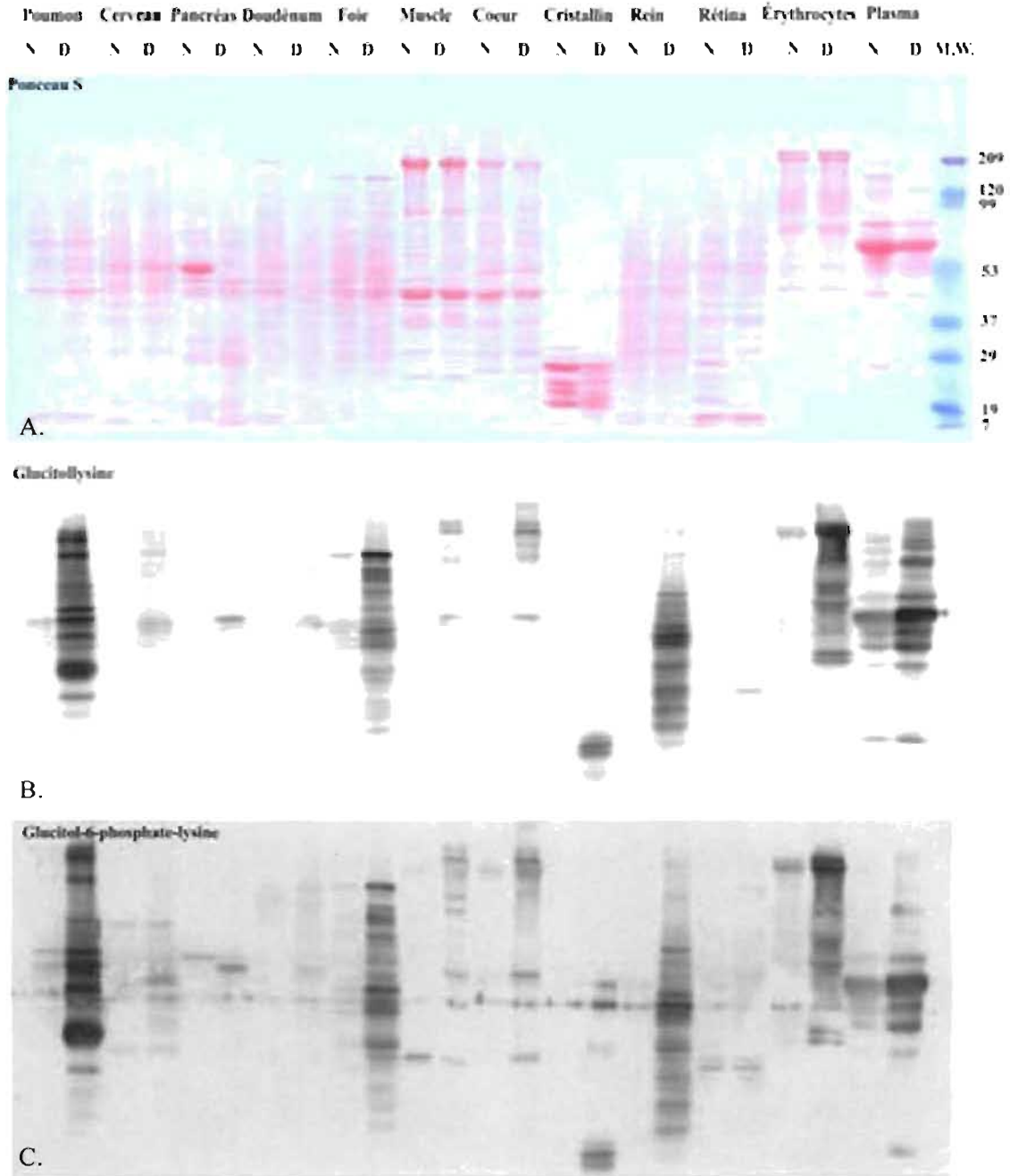


Figure 11 : Évaluation du niveau de glycation dans différents organes du rat diabétique.

Coloration en Rouge Ponceau (A). Immunobuvardage avec des anticorps glucitolysine (B)

et glucitol-6-phosphate-lysine (C) effectué sur des organes des rats diabétiques et normaux.

N-animaux contrôle, normoglycémiques; D-animaux diabétiques (3 mois).

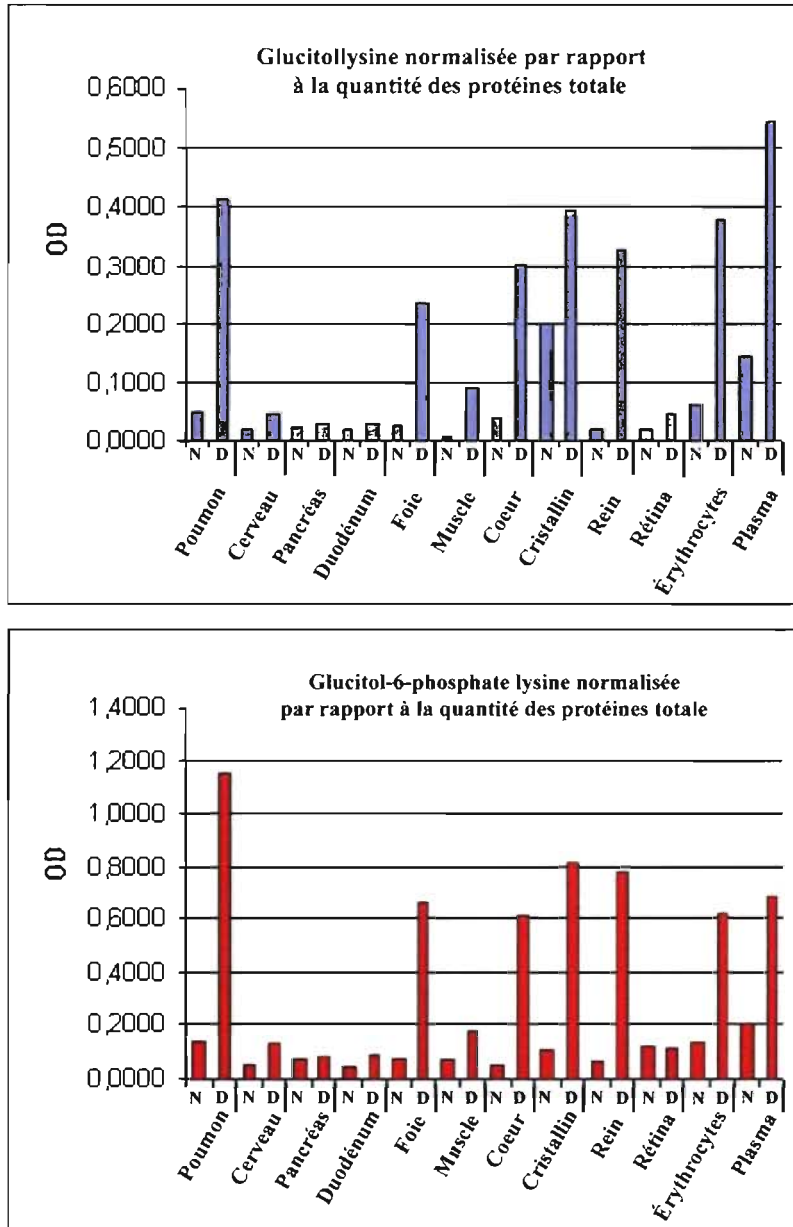


Figure 12 : Évaluation quantitative du niveau de glycation par intégration densimétrique effectuée sur l'immunobuvardage avec anti-glucitolysine (A) et anti-glucitol-6-phosphate lysine (B). N-animaux contrôle, normoglycémiques; D-animaux diabétiques (3 mois).

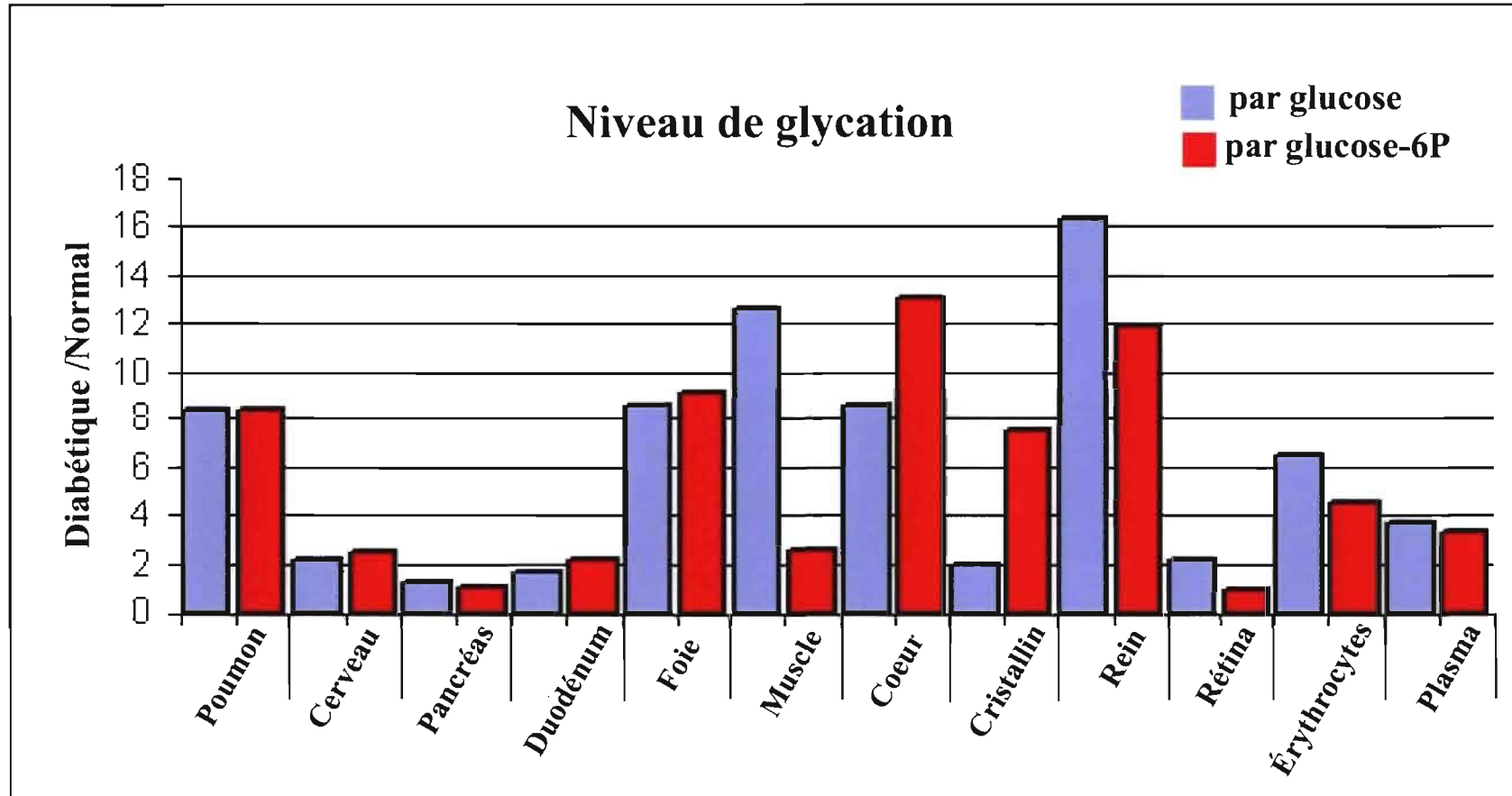


Figure 13 : L'augmentation du niveau de glycation par le glucose et glucose-6-phosphate au cours du diabète dans de différents organes du rat.

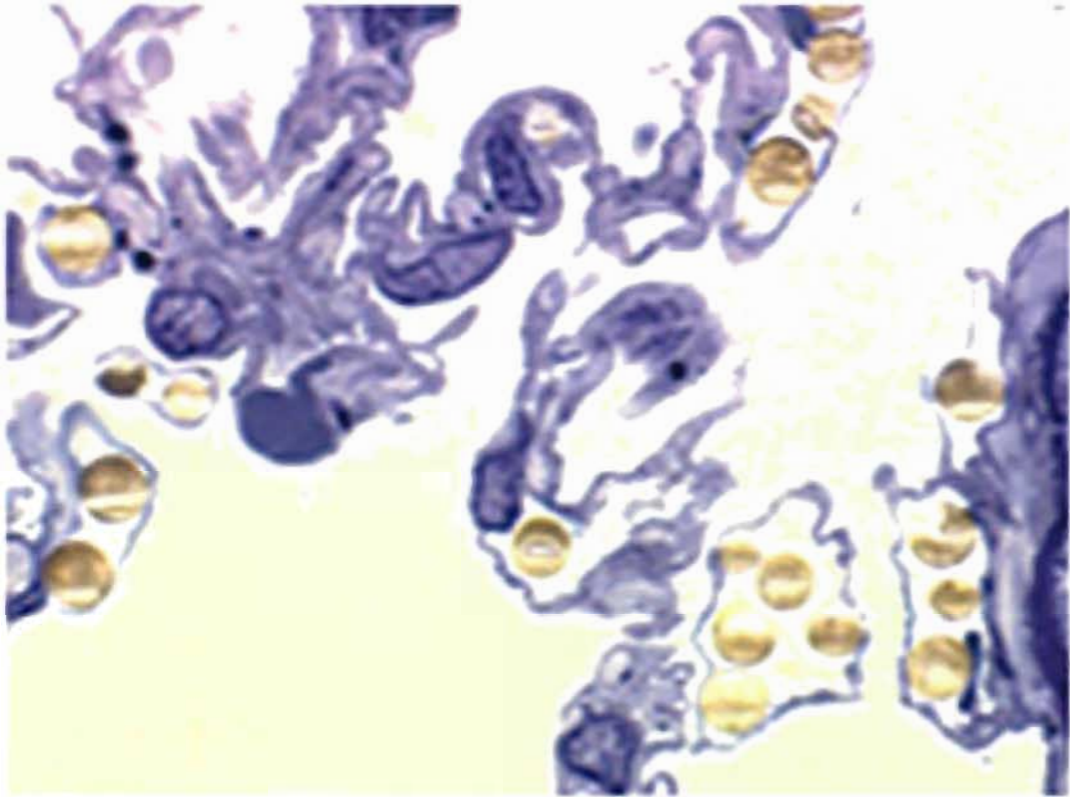
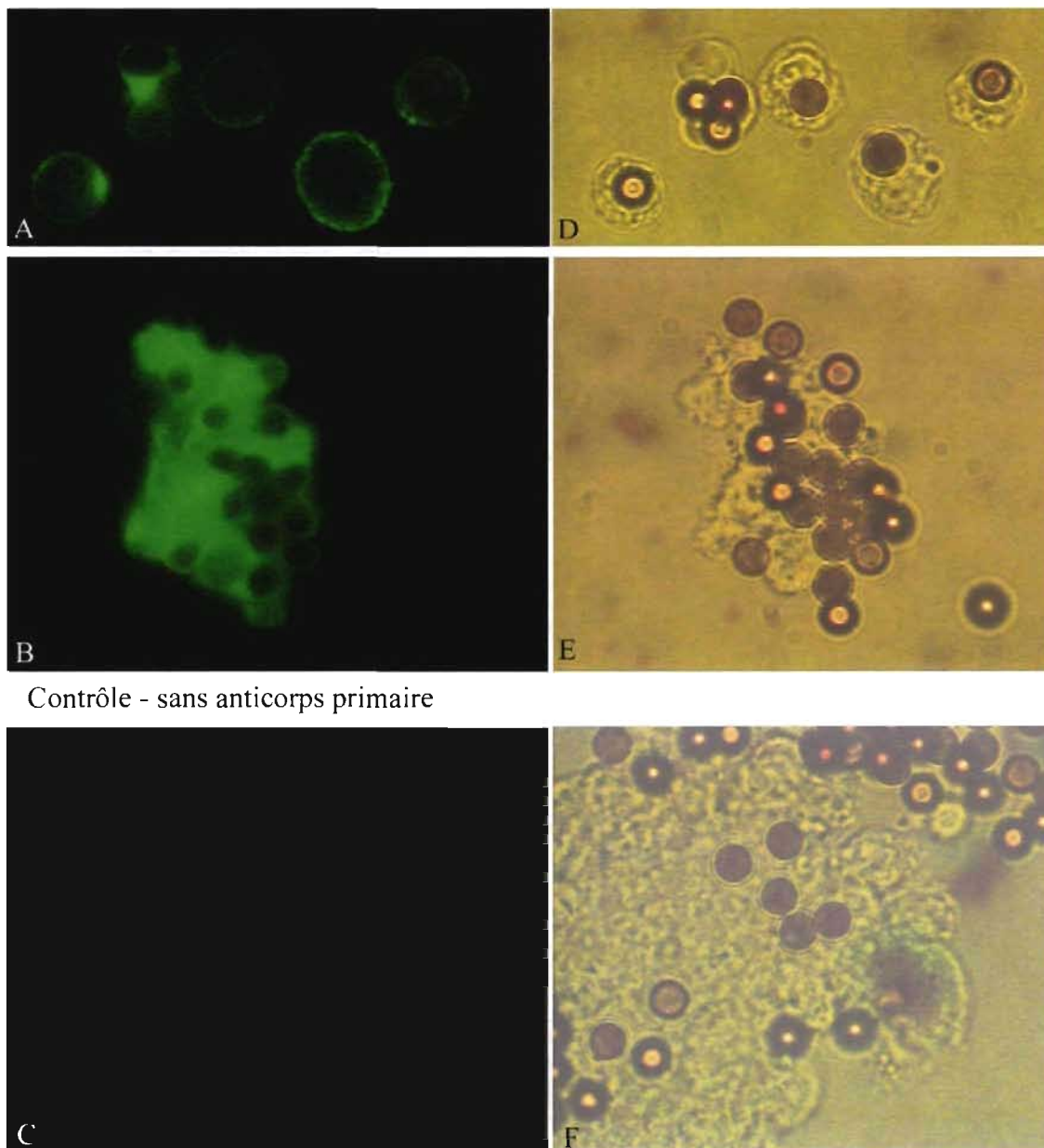


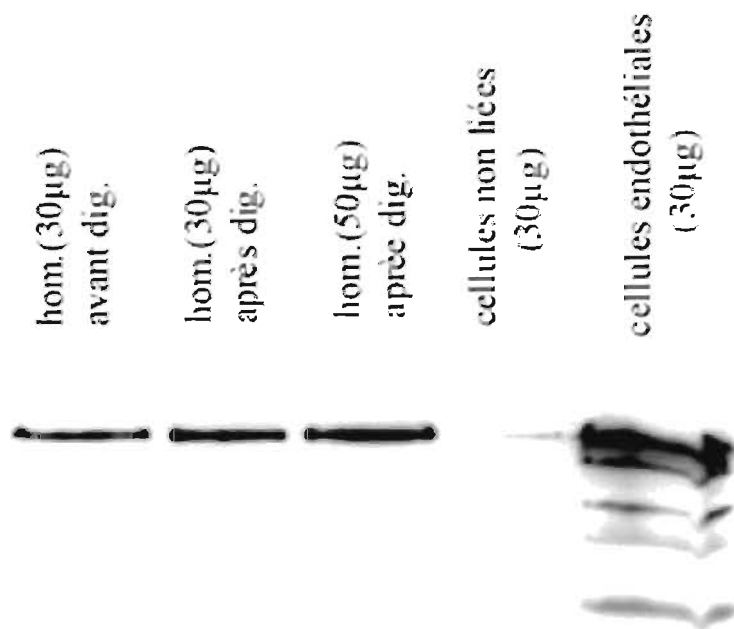
Figure 14 : Poumon de rat perfusé avec des billes magnétiques (4.5 μ m) recouvertes d'anticorps anti ACE. Coupe semifine, coloration par bleu de toluidine.

Immunofluorescence avec des anticorps anti CD34

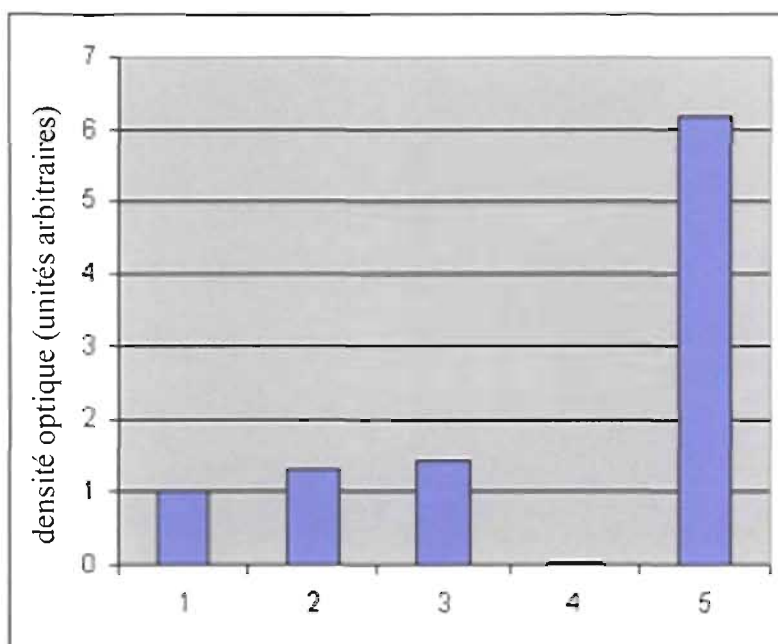


Contrôle - sans anticorps primaire

Figure 15: Cellules endothéliales de poumon de rat immuno-sélectionnées avec des anticorps anti enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) immobilisées sur des billes magnétiques. Immunofluorescence avec l'anticorps pan-endothélial CD34 (A, B et C) comparativement aux images des mêmes cellules enregistrées en lumière visible (D, E et F). Séries d'images de cellules endothéliales dispersées (A, D) et en amas (B, E). Le contrôle exclut l'anticorps primaire.



A. **immunobuvardage avec anti-ACE**



B.

Figure 16 : Enrichissement en ACE des cellules immunosélectionnées. Immunobuvardage avec anticorps anti ACE d'homogénat du poumon, des cellules non liées par les billes magnétiques et des cellules ayant des billes magnétiques attachées (A). Quantification densimétrique de l'intensité du signal immunochimique (B).

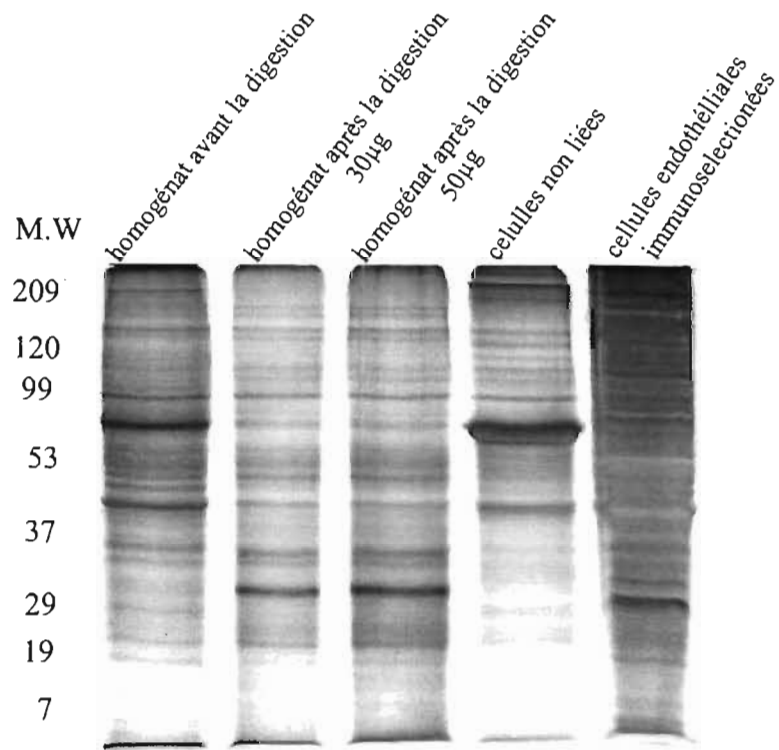


Figure 17 : Profil électrophorétique des principales fractions du protocole d'isolation des cellules endothéliales pulmonaires. Coloration à l'argent.

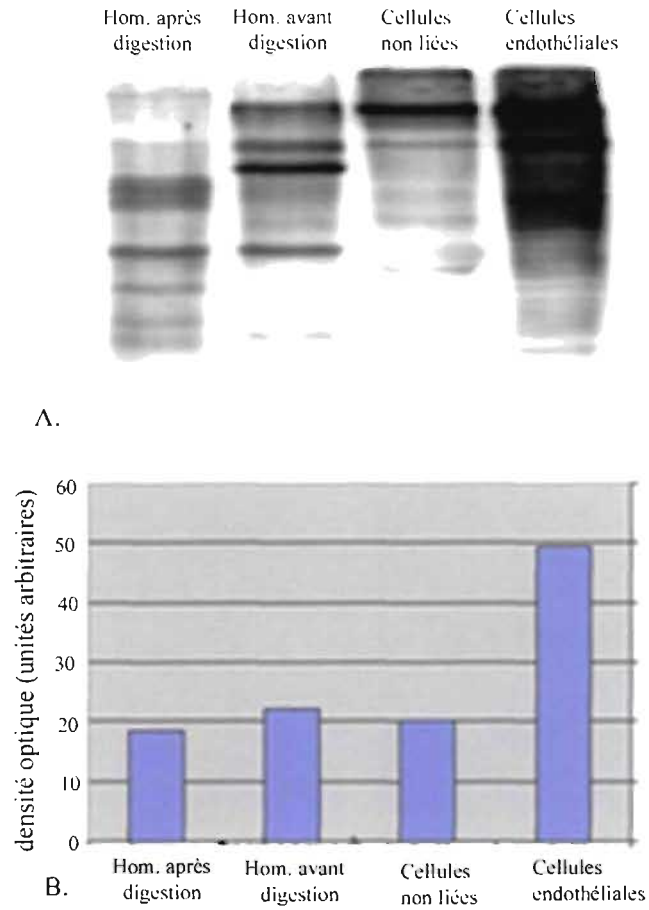


Figure 18 : Le niveau de glycation des protéines dans principales fractions obtenues au cours de l'isolation des cellules endothéliales pulmonaires.

Immunobuvardage avec anti glucitollysine (A) et évaluation densitométrique du signal immunochimique (B) enregistré sur l'ensemble des protéines de chaque échantillon.

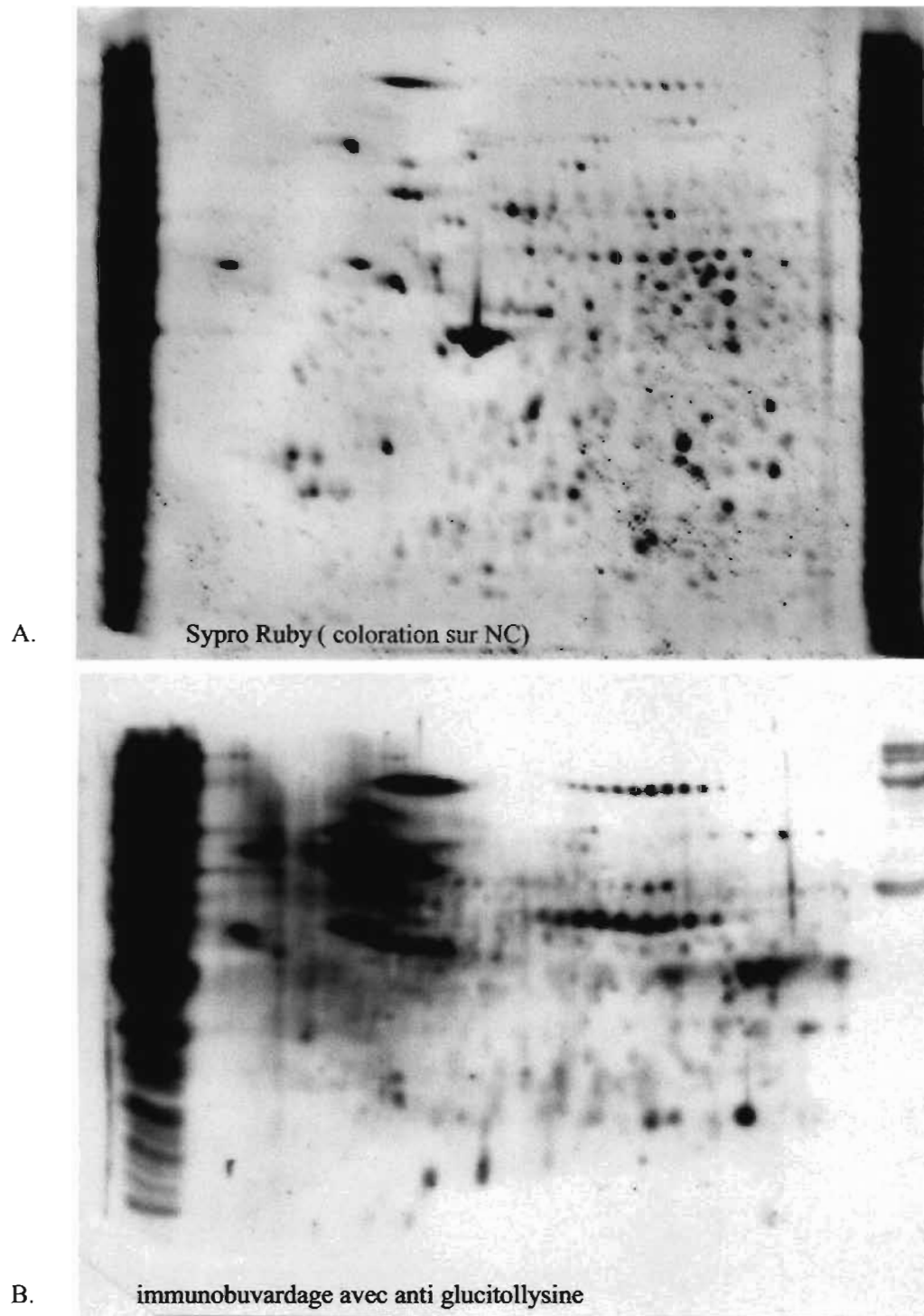


Figure 19 : Localisation des protéines glyquées dans le profile électrophorétique bidimensionnel des cellules endothéliales du poumon de rat diabétique. A- coloration par Sypro Ruby sur membrane de nitrocellulose (NC). B- immunobuvardage avec anti glucitolysine.

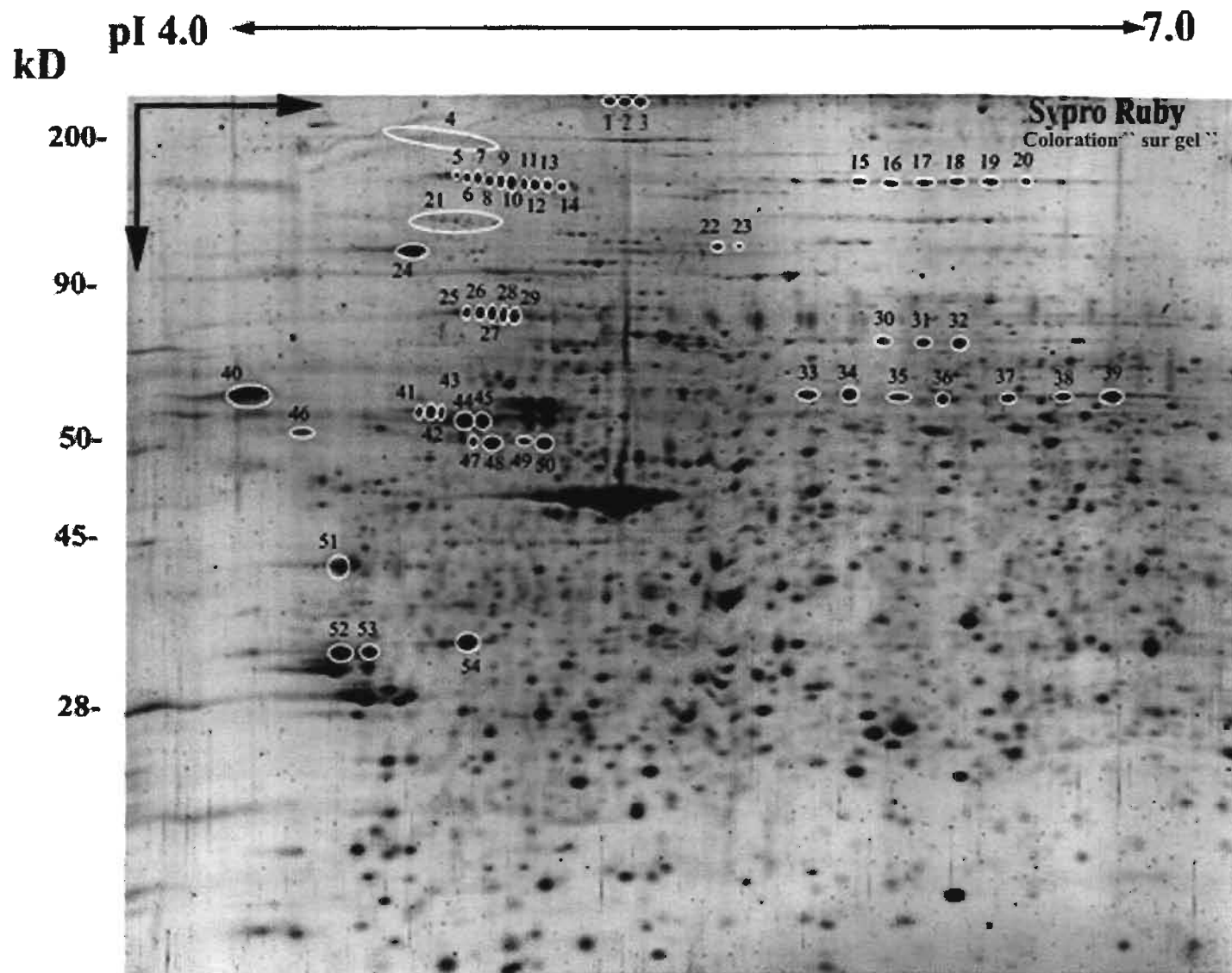


Figure 20 : Le spectre des protéines endothéliales de poumon de rat (800 μ g). Coloration par Sypro Ruby sur gel et identification des protéines endothéliales glyquées. Les spots les plus intensément colorées ont été coupées et analysées en spectrométrie de masse (LC-QTOF).

Tableau I: La liste des protéines endothéliales du poumon de rat, glyquées

Spot	Protéine identifiée	Numéro d'accès	Nombre de peptides identifiés	Score total	pI	MW
1	actine bêta	NM 031144	11	704	5,29	42066
4	laminine chaîne B2	XM 341133	32	1521	4,81	182975
10	procollagène, type VI, alpha 1	XP 215375	51	1123	4,92	109562
17	procollagène, type VI, alpha 2	XP 342116	10	514	5,96	111406
21	intégrine bêta 1	BC 131845	5	240	5,52	91386
24	antigène de rejection tumorale gp 96	XM 343192	97	1605	4,52	74390
27	transglutaminase tissulaire	AF 106325	39	1518	5,57	78021
32	albumine	BC 085359	51	1447	6,21	70670
34	disulfide-isomerase ER-60	P 11598	71	1459	5,78	57044
39	carboxylesterase 3	XM 346519	34	672	6,82	62363
40	calréticuline	NP 071794	17	513	4,22	48137
42	tubuline bêta 2	XM 216012	14	860	4,81	50225
44	tubuline bêta 5	NP 035785	8	1374	4,96	50035
45	tubuline bêta chaîne	P02554	135	135	4,78	50285
48	ATP synthase, sous unité bêta	XP 343137	147	1924	4,81	51171
50	vimentine	NM 031140	16	908	5,52	53757
51	CaBP1(protéines liant le calcium)	X 79328	53	1040	4,52	47590
52	tropomyosine 1, isoforme alpha	NM 012678	41	801	4,52	32773
53	tropomyosine 4	NP 036810	104	967	4,63	28549
54	annexine 5	NP 037264	139	1565	4,93	33944

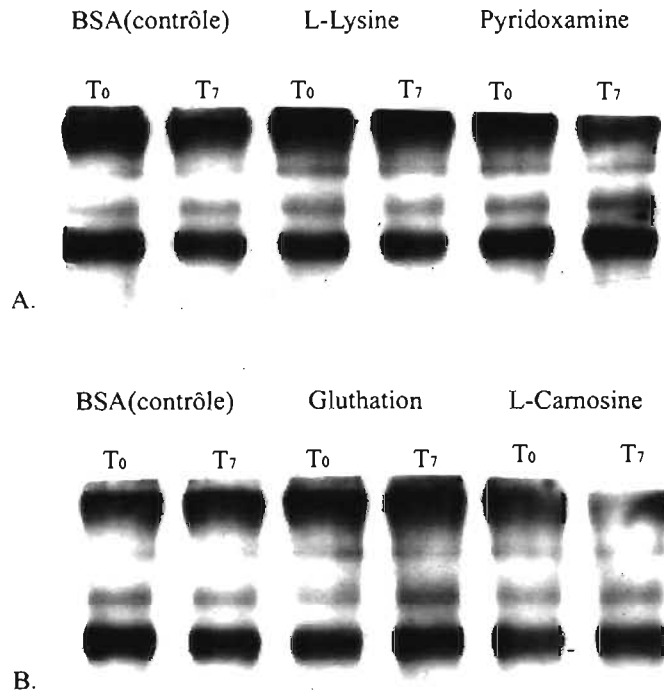


Figure 21 : L'effet des inhibiteurs de la formation des AGEs sur la stabilité des produits de glycation précoce. BSA glyquée par D-glucose, incubée avec un excès molaire de 1 000 de: L-lysine et pyridoxamine (A), glutathion et L-carnosine (B) au moment initial (T0) et 7 jours après (T7).

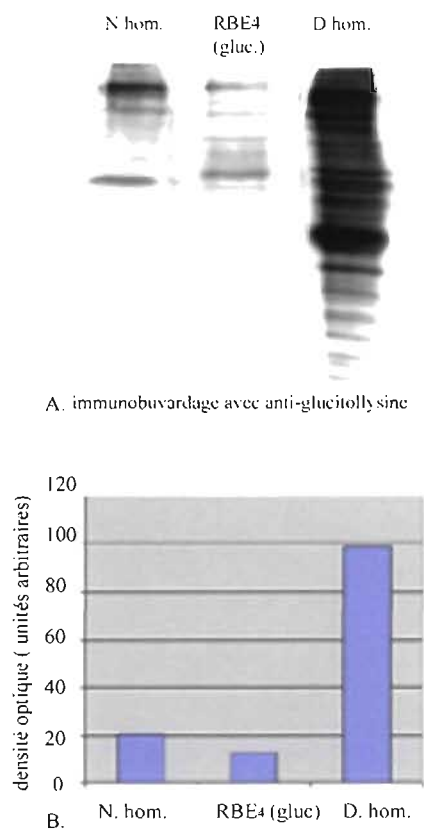


Figure 22 : Les protéines de cellules de la ligne RBE4 cultivées pour 12 jours dans des conditions hyperglycémiques (30 mM glucose) restent très faiblement glyquées par rapport à l'homogénat de poumon du rat diabétique. N hom.- homogénat de poumon de rat normoglycémique ; D hom.- homogénat de poumon de rat diabétique; A – immunobuvardage avec des anticorps anti glucitollysine; B – évaluation densimétrique du signal immuno-chimique.

G. DISCUSSIONS

La glycation ou l'attachement covalent des sucres réducteurs aux groupes aminés des protéines (principalement lysine) est une modification post-traductionnelle non enzymatique fortement favorisée par l'hyperglycémie. Par conséquent, elle est bien présente au cours du diabète et le taux d'hémoglobine glyquée est utilisé en clinique comme paramètre d'évaluation de l'avancement de la maladie. La réactivité des sucres envers les protéines dépend de leurs concentrations et de leur présence dans une forme acyclique. (*Monnier, Baynes et Monnier, 1988*). Des études effectuées *in vitro* ont montré que des sucres comme les trioses, le ribose, le fructose ou glucose-6-phosphate ont une capacité glycante bien supérieure à celle du glucose (*Brownlee, 1992*). Pourtant, le glucose représente l'agent dominant de glycation *in vivo* pour le plasma sanguin et pour les composants de la matrice extracellulaire (*Brownlee, 1992*), ainsi que pour les protéines de la membrane plasmique des cellules endothéliales (*Nguyen, Pascariu, Ghitescu 2006*). L'explication résiderait dans le fait qu'au cours du diabète la concentration de glucose augmente significativement, ce qui, probablement, n'est pas le cas des autres sucres mentionnés. En fait, des données sur les variations induites par le diabète de la concentration de chaque sucre dans le liquide interstitiel ou dans le cytosol sont, à date, inexistantes.

Le dépistage du niveau de glycation des protéines dans une panoplie de douze organes a montré que, chez les animaux normoglycémiques, les taux de glucitolysine et de glucitol-6-phosphate lysine sont, en général, très bas (Fig. 12A et B, échantillons marqués

par N). Seulement le cristallin et le plasma sanguin font exception, (Fig. 12A) probablement à cause de la longue durée de vie de ses protéines pour le premier, et par les augmentations temporaires, post prandiales, de glucose dans le sang pour le deuxième.

Il est remarquable qu'à l'état normoglycémique, les protéines de la membrane plasmique des érythrocytes sont sensiblement moins glyquées que les protéines du plasma sanguin, même si leur durée de vie est supérieure à celles-ci. Cette observation attire l'attention sur le rôle important de la membrane plasmique dans le maintien d'un gradient de concentration de glucose entre le liquide du sang ou interstitiel (plus grande) et l'intérieur des cellules (moins élevée).

Nous avons été surpris de constater que, chez les animaux diabétiques, les taux de glucitolysine et glycitol-6-phosphate lysine augmentent de manière très différente d'un organe à l'autre (Fig. 13). Dans les tissus du cerveau, du pancréas, de l'intestin et, curieusement, de la rétine, cette augmentation est minimale (1-2 fois) pour les deux sucres. Par contre, l'hyperglycémie a un très fort impact sur le taux de glucitolysine détectée dans les protéines du rein (augmentation de 16 fois), du muscle squelettique (13 fois), du cœur et du poumon (9 fois). Même si la concentration de glucose est identique dans le liquide interstitiel de tous les organes, des différences concernant les transporteurs transmembranaires de glucose (GLUTs) et des particularités du métabolisme des glucides produisent, apparemment, des variations notables de la concentration intracellulaire de glucose et glucose-6-phosphate entre les tissus examinés. Selon les images d'immunobuvardage (Fig. 11B et C), ces deux sucres sont en compétition pour les mêmes sites de liaison sur les protéines.

Si les taux de glucitolysine et glucitol-6-phosphate lysine sont normalisés par rapport à la quantité de protéines, nos résultats montrent que le poumon est l'organe dont les polypeptides, au cours du diabète, sont les plus glyqués (Fig. 12A et B). Nous avançons l'hypothèse que cette propension du poumon à la glycation serait due au vaste réseau vasculaire de cet organe. Environ 30 % de toutes les cellules du poumon de rat sont des cellules endothéliales (*Haies, Gil et Weibel, 1981*) intimement exposées aux conditions de glycémie du plasma sanguin. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les autres organes fortement glyqués – le foie, le cœur et le rein possèdent également un lit vasculaire bien développé. Le type de transporteur de glucose qui se trouve dans les cellules endothéliales du poumon n'est pas encore connu. On considère que toutes les cellules endothéliales seraient munies de transporteurs à haute affinité, insensibles à l'insuline, de type GLUT-1, mais ce-ci n'est qu'une extrapolation des données issues de la barrière sang-cerveau (*Virgintino et al., 2000*), des capillaires rétiniens (*Knott et al., 1996*) et du cœur (*Hirsch et Rösen, 1999*). Néanmoins, la seule étude menée sur la vascularisation pulmonaire (*Devaskar et DeMello, 1996*) n'a pas réussi à mettre en évidence, dans les cellules endothéliales alvéolaires, l'un des transporteurs GLUT 1 à 5, ni le co-transporteur sodium-glucose.

Les cellules du poumon de rat diabétique, isolées par immunoabsorption sur des billes magnétiques recouvertes d'anticorps anti ACE, sont fortement enrichies en deux marqueurs endothéliaux - la molécule d'adhésion CD34 (Fig. 15) et l'ACE elle-même (Fig. 16). Le niveau de glycation de ces cellules, qui s'avèrent endothéliales par le test précédent, est significativement plus élevé que celui de l'homogénat total du même poumon. (Fig. 18), ce qui renforce que notre hypothèse sur la « vulnérabilité » des cellules endothéliales au processus de glycation.

Par immunobuvardage avec les anticorps anti glucitollysine (Fig. 20) nous avons trouvé que seulement une fraction réduite de l'ensemble de protéines endothéliales est glyquées et celle-ci ne se trouve pas parmi les polypeptides les plus abondants. Évidemment, cette observation soulève la question si la condensation des sucres avec les résidus lysine ne requière pas un micro environnement spécial, ou une séquence particulière d'acides aminés. Des études récentes ont démontré que la molécule d'albumine possède plusieurs «points chauds» pour la réaction de glycation, chacun spécifique soit au glucose ou au méthylglyoxal (*Ahmed et al., 2005; Wa et al., 2007*). Pourtant, l'ensemble des données sur les sites de glycation de l'albumine, de l'hémoglobine (*Gao et Wang, 2006*) et de la ribonucléase (*Brock et al., 2007*) n'indique aucune séquence consensus pour cette réaction.

Des contraintes budgétaires ne nous ont permis d'analyser par spectrométrie de masse que seulement 20 des 54 spots identifiés comme polypeptides glyquées par immunobuvardage (Fig. 20 et Table I). Néanmoins, par leur position relative dans l'ensemble des protéines étalées par électrophorèse bidimensionnelle, celles qui ont été omises ne semblent être que des formes post-traductionnellement modifiées d'un spot représentatif choisi et analysé pour chaque groupe.

L'ensemble des protéines glyquées identifiées dans la fraction cellulaire endothéliale peut être regroupé selon leurs fonctions en:

a. Protéines contaminants provenant du plasma sanguin. Seulement l'albumine, présente en très petites quantités et adsorbée à la surface des cellules a été détectée (spot 32)

b. Protéines appartenant à la matrice extracellulaire ou à la membrane basale des cellules. Dans cette catégorie, deux molécules – la laminine et le collagène type VI ont été trouvées. La laminine est le plus important composant non-collagène de la membrane basale. De nombreuses études ont démontré son rôle dans l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire, dans la motilité cellulaire associée à la croissance et dans la différenciation cellulaire. Sa structure comporte trois chaînes polypeptidiques distinctes – la chaîne A (440 kDa) et les chaînes B1 et B2, chacun d'environ 200 kDa, liées par des ponts disulfides pour donner la forme caractéristique, en croix, bien observable en microscopie électronique (*Beck, Hunter et Engel, 1990*). La structure de la laminine comporte de multiples domaines régissant l'auto-association de la molécule dans un réseau tridimensionnel, ainsi que les interactions avec d'autres composants de la membrane basale, particulièrement le nidogène / l'entactine, le protéoglycane héparane sulfate, et avec les récepteurs de type intégrines de la membrane plasmique (pôle basale) des cellules.

La glycation *in vitro* de la laminine altère sa structure en croix et diminue sa capacité de former un réseau (*Tarsion, Reger et Furcht, 1988; Charonis et al., 1990; Charonis et Tsilbary, 1992*). On attribue à cette altération moléculaire des répercussions à l'échelle de

l'ensemble de la structure et de la fonction de la membrane basale. Mises en culture sur un substrat contenant de la laminine glyquée, les cellules endothéliales (*Haitoglou et al., 1992; Kalfa et al., 1995*) et les neurones (*Luo et al., 2002; Oztürk et al., 2006*) présentent des déficiences d'adhésion, de prolifération et de survie. L'épaississement général de la membrane basale, associé au diabète, est certainement dû à la surexpression des protéines de matrice extracellulaire déclenchée par l'hyperglycémie.

Le collagène type VI est une variété de collagène qui présente une haute affinité pour l'interaction spécifique avec les protéoglycanes (décorine, biglycane, hyaluronan, héparane sulfate) et avec le collagène type 2, mais également avec les intégrines $\alpha_1 \beta_1$ (*Wiberg et al., 2003; Leitinger et Hohenester 2007*). Par ces interactions, le collagène type VI stabilise les protéoglycanes dans le réseau de collagène de la matrice extracellulaire. Le fait que le collagène type VI soit glyqué chez les animaux diabétiques est chose commune; en fait toutes, ou la plupart des protéines de la matrice cellulaire les sont et développent avec le temps des PTAG (*Makino et al., 1995; Boyd-White et Williams Jr., 1996; Bendayan, 1998*). Ce qui nous a surpris a été plutôt l'absence du collagène type IV, un composant important de la membrane basale endothéliale, du groupe des protéines glyquées.

c. Protéines de la membrane plasmique endothéliale. L'intégrine $\beta 1$ est la seule protéine intégrale glyquée de la membrane plasmique endothéliale (spot no.21). Elle fait partie d'une population de 18 chaînes α et 8 β qui dimérisent selon le modèle $\alpha \beta$ pour créer, (au front abluminal pour la cellule endothéliale) des récepteurs aux macromolécules de la membrane basale. Par leurs segments cytoplasmiques les intégrines se lient aux

microfilaments d'actine. Cet emplacement leur permet de remplir non seulement un rôle dans l'ancrage mécanique des cellules à la matrice extracellulaire, mais de transmettre, par l'entremise des protéines adaptatrices et kinases associées, des signaux vers l'intérieur de la cellule. On ne connaît pas la composition spécifique en intégrines de la membrane plasmique des cellules endothéliales pulmonaires. Par conséquent il sera très difficile de spéculer sur les répercussions physiologiques de la glycation d'un seul membre de ces récepteurs multiples.

L'annexine 5 comme la plupart des autres membres de la famille des annexines sont des polypeptides capables de lier des phospholipides en présence de Ca^{2+} . Elles sont majoritairement des protéines intracellulaires mais l'annexine 5 se trouve également dans le sang. Le mécanisme de sa sécrétion est inconnu car elle manque de peptide signal pour exocytose. Les annexines 1, 2 et 6 ont été liées au trafic des membranes (*Futter et White, 2007*), mais rien n'est pas connu à date sur le rôle de l'annexine 5, malgré son utilisation courante en tant que détecteur de phosphatidyl sérine dans le feuillet externe de la membrane plasmique et de marqueur pour les cellules en apoptose. Nous avons récemment trouvé que, dans les membranes plasmiques purifiées de cellules endothéliales pulmonaires, les annexines 1, 2 3 et 4 sont glyquées, elles aussi (*Nguyen, Pascariu et Ghitescu, 2006*).

d. Protéines du cytosquelette. Nous avons trouvé que des protéines des microfilaments (actine β , tropomyosine) et des microtubules (tubulines β_2 , tubulin β_5) sont affectées par le processus de glycation. Des études antérieures effectuées dans notre laboratoire (*Ghitescu, Gugliucci et Dumas, 2001, Nguyen, Pascariu et Ghitescu, 2006*) ont démontré que l'actine associée à la membrane plasmique endothéliale est fortement glyquée chez les rats

diabétiques de trois mois. Au cours de la séparation électrophorétique cette actine glyquée migre à 55 kDa. Nos résultats présents identifient l'actine glyquée à un poids moléculaire supérieure à 200 kDa. Il est possible que la différence résulte du fait que : (1) ce dernière représente majoritairement l'actine cytosolique et (2) après un an d'hyperglycémie, l'actine glyquée se transforme en produits de glycation avancée, de grande taille. On ignore dans quel sens cette modification moléculaire altère la fonction du cytosquelette. Il est connu que dans les myocytes, la tubuline libre dans le cytosol stimule l'adénylate cyclase qui, à son tour, induit des courants de Ca^{2+} transmembranaires plus intenses et plus rapides (*Kerfant et al., 2001*). Dans les mêmes myocytes, isolés du rat rendus diabétique par la streptozotocine, les microtubules sont plus stables que dans le contrôle, et la variation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} et le raccourcissement de la cellule sont, tous deux, réduits (*Shiels et al., 2007*). Le fait que la majorité des protéines du cortex cellulaire est ciblée par la glycation nous a conduit à l'hypothèse que ce processus se situerait à l'origine des altérations de la fluidité de la membrane plasmique (*Cester et al., 1996*), avec des répercussions négatives sur la fonction de mécanotransducteur de la cellule endothéliale.

e. Protéines du métabolisme cellulaire. Le fait de trouver parmi les protéines endothéliales glyquées une sous unité d'une enzyme clé du métabolisme mitochondrial ouvre une intéressante perspective sur l'altération de la production cellulaire d'énergie au cours du diabète. Le polypeptide en question (spot 48) est la sous unité bêta de l'ensemble F_1 de l'ATP synthétase, localisée dans la membrane interne mitochondriale. L'enzyme a une forme qui ressemble à celle d'un champignon: une tige transmembranaire (F_0), en fait un canal pour les protons, un «cou annulaire» solidaire à un axe qui tourne quand les protons traversent le canal vers la matrice et, autour de cet axe, comme une protubérance orientée vers la matrice mitochondriale, une partie fixe (l'ensemble F_1), composée de trois

ensembles supramoléculaires, chacun ayant deux sous unités, alpha et bêta. Celles-ci possèdent la propriété d'utiliser le gradient électrochimique transmembranaire des ions d'hydrogène, bâti et entretenu par les transporteurs de la chaîne de la respiration mitochondriale, pour catalyser la liaison entre un groupe phosphate et la molécule d'ADP. Le mécanisme moléculaire de cette activité enzymatique se réduit donc à un cycle de transformations conformationnelles des sous unités alpha et bêta qui ouvrent successivement les sites de liaisons pour l'ADP, le phosphate et libèrent l'ATP. La phosphorylation de la sous unité bêta est importante pour que de telles transformations prennent place (*Højlund et al., 2003*). Il est déjà connu que la capacité de synthétiser l'ATP des mitochondries des cellules musculaires squelettiques des patients diabétiques est réduite (*Højlund et al., 2003*). Ceci pourrait être la conséquence d'une diminution de l'expression de l'enzyme, mais aussi bien d'une altération dans le fonctionnement de celle-ci. Le fait qu'elle soit glyquée chez les animaux diabétiques rend cette hypothèse plausible.

f. Protéines de la machinerie de synthèse protéique. Un nombre de quatre protéines glyquées - la gp96, la calréticuline, la CaBP1 et la disulfide isomérase ER60 - jouent un rôle clairement défini dans l'assemblage co- et post-traductionnel des protéines dans le réticulum endoplasmique.

La gp96 (l'antigène de rejet tumoral - tumor rejection antigen) est une glycoprotéine présente dans la lumière du réticulum endoplasmique. Son rôle présumée est d'agir en transporteur intermédiaire de peptides vers le complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) classe I (*Li et Srivastava, 1993, Singh-Jasuja et al., 2000*). Son nom provient du fait que la gp96 a été trouvé en complexe avec des antigènes des cellules cancéreuses en train d'être

synthétisés et utilisée comme immunogène anti tumoral. Au cours du diabète l'expression de gp 96 diminue (*Turko et Murad, 2003*). Nous ne pouvons pas nous empêcher de spéculer que cette diminution puisse conduire aux dysfonctions diabétique de la réponse immunitaire (*Altmeyer et al., 1996, Multhoff et al., 1997*), car la cellule endothéliale exprime MHC classe I (nos données, non publiées) et possède la capacité de présentation d'antigènes (*Bagai et al., 2005; Smyth et al., 2006*). Pourtant, l'hypothèse de la fonction de chaperon de la gp 96 a été récemment contestée par un travail qui a montré que la stoechiométrie de l'association gp96-peptide est très faible et que des différences notables existent entre les peptides liés par le MHC classe I et celles associées à la gp96. (*Demine et Walden, 2005*)

La calréticuline fait partie du système de chaperons du réticulum endoplasmique qui assure le repliement correct et le «contrôle de qualité» des glycoprotéines nouvellement synthétisées. La spécificité pour les glycoprotéines est donnée par un site de type lectine qui reconnaît la structure $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ présente à une étape initiale sur les glycoprotéines en formation. Les cellules endothéliales vasculaires cultivées dans un milieu hyperglycémique, surexpriment la calréticuline. Des études récentes, ont montré que cette protéine est responsable de la dégradation de mRNA –GLUT-1 *in vitro* (*Totary-Jain et al., 2005*) ce qui pourrait avoir des conséquences sur l'expression de ce transporteur de glucose dans les cellules des animaux diabétiques.

La disulfide-isomerase ER-60, est une cystéine protéase présente dans le réticulum endoplasmique(ER). Elle contient deux domaines thioredoxines et catalyse la formation de ponts S-S intra ou inter chaînes polypeptidiques. Le rôle de la disulfide-isomerase est de

dégrader les protéines mal formées et d'empêcher leur transport dans le compartiment Golgien (*Urade et Kito, 1992*). Chez les patients avec une néphropathie diabétique l'activité altérée de ER-60 conduit à des accumulations des protéines anormales dans le rein et d'autres tissus (*Tessari et al., 2007*). Il est également possible qu'une modification par glycation de la disulfide-isomérase ER-60 conduise à des changements dans la structure des protéines intracellulaires et dans leur durée de vie, du genre observé dans les fibroblastes des patients diabétiques (*Tessari et al., 2007*).

La deuxième disulfide-isomérase A6 ou la CaBP1 (calcium binding protein 1) (spot 50), détectée comme protéine glyquée dans la population des cellules endothéliales pulmonaires, détient un rôle similaire à celui de la précédente (*Fuellekrug et al., 1994*).

Même si elle n'est pas localisée dans le réticulum endoplasmique comme les protéines précédentes, une autre enzyme ubiquitaire glyquée - la transglutaminase tissulaire (TGase 2), (spot no. 27) - joue un rôle important dans les modifications post-traductionnelles des protéines. Son activité est dépendante de Ca^{2+} , de la guanidine triphosphate (GTP) et de l'oxyde nitrique (*Achyuthan et al., 1987, Melino et al., 1997*). Cette enzyme catalyse les réactions de transamidation des résidus de glutamine des polypeptides dans le cytoplasme des cellules, mais également dans l'espace extracellulaire (*Bernassola et al., 2002*). Suite à ces réactions, des chaînes de ϵ (γ -glutamyl)-lysine entre protéines sont formées, les liaisons sont irréversibles, très fortes, et résistent à la protéolyse. (*Jonhson et al., 2003*). À part la capacité de former des liaisons croisées entre les protéines, cette enzyme possède d'autres fonctions importantes dans la cellule. Elle agit en isopeptidase dépendante de Ca^{2+} , et elle est également impliquée en tant que GTPase dans

la transmission des signaux par l'entremise de l'inositol phosphate, en couplant les adrénorécepteurs α_{1b} et α_{1d} , et ceux de thromboxane et de l'oxytocine à la phospholipase C (Nakaoka et al., 1994; Fesus et Piacentini, 2002). Un rôle dans la phosphorylation de IGFBP-3 (insulin-like growth factor binding protein-3) a été récemment associé à la TG2, en lui attribuant en plus la fonction d'une kinase (Mishra et Murphy, 2003). Dans le sérum des patients diabétiques, des auto-anticorps dirigés contre la transglutaminase ont été détectés (Miao, Yu et Eisenbarth, 2007). Chez les souris déficientes en transglutaminase 2, une réduction dans la sécrétion d'insuline conduisant à l'hyperglycémie et à l'intolérance au glucose a été décrite (Bernassola et al., 2002).

Nous avons essayé d'établir un modèle convenable en culture pour l'étude de la glycation des protéines endothéliales, en nous basant sur l'idée que la vie des protéines intracellulaires ne dépasse pas quelques jours, *in vitro* comme *in vivo*. Dans ce raisonnement, le temps d'exposition de chaque protéine aux conditions hyperglycémiques devrait être identique dans l'animal, ainsi que dans une culture cellulaire de quelques jours. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé des cellules endothéliales du cerveau de rat (la lignée RBE₄), une population cellulaire stable avec un phénotype non transformé et une morphologie endothéliale. Les cellules RBE₄ forment en culture une monocouche confluente, et expriment plusieurs enzymes caractéristiques à la microvascularisation du cerveau de rat, comme la γ GTP (gamma-glutamyl transpeptidase), la ALP (enzyme alcaline phosphatase) et la i NOS (nitric oxide synthase inductible), des transporteurs tels que P-gp (P-glycoprotein), MRP (multidrug resistance-associated protein) et GLUT₁, ainsi que le récepteur à la transferrine (Roux et al., 1994, Regina et al., 1998). Ces cellules sont capables de sécréter aussi des facteurs vasoactifs dérivés des cellules endothéliales comme l'endothéline et l'oxyde nitrique (Durieu-Trautman et al., 1993). Cultivées en milieu

hyperglycémique (30mM glucose) pour 12 jours, les cellules RBE4 ont donné un signal très faible par l'immunobuvardage avec les anticorps anti glucitolysine

(Fig. 22), surtout en comparaison avec le niveau de glycation enregistré dans les cellules endothéliales isolées de poumon. Ces différences notables sont probablement dues à une adaptation de ces cellules à leur environnement hyperglycémique et se traduit par une diminution de l'expression des transporteurs de glucose.

Nous avons montré donc que, malgré le fait que toutes les cellules du corps «baignent» dans un milieu liquide de concentration uniforme de glucose, le processus de glycation se déroule avec des intensités différentes d'un tissu à l'autre et concerne des polypeptides spécifiques à l'organe. La cellule endothéliale vasculaire semble représenter une cible préférentielle pour ce processus. Dans l'endothélium pulmonaire un nombre relativement réduit de protéines intracellulaires sont glyquées. Pourtant, ces polypeptides sont impliqués dans des aspects essentiels de la physiologie cellulaire – structure du cytosquelette et motilité cellulaire, production d'ATP par les mitochondries et repliement correct des chaînes polypeptidique au cours de leur synthèse dans le réticulum endoplasmique.

L'évaluation globale de nos résultats montre, néanmoins, que l'étude ici présentée a généré plus de questions que de réponses. Voici quelques unes qui attendent de futurs projets pour recevoir une réponse:

- pourquoi y a-t-il de telles grandes différences dans le processus de glycation d'un organe à l'autre ?

- quelle est la relation entre les transporteurs transmembranaires de glucose et le métabolisme des glucides dans le maintien du niveau de concentration intracellulaire de glucose ?

- pourquoi seulement certaines protéines intracellulaires sont glyquées ?

- est-ce que l'accrochage covalent de quelques molécules de sucre sur une protéine altère vraiment la fonction de celle-ci ?

- pourquoi les cellules en culture sont tellement réfractaires au processus de glycation ?

- est-ce que dans un animal diabétique le taux de réussite dans la maturation de la structure tridimensionnelle des protéines diminuent ?

- est-ce que, chez les diabétiques, cela se répercute sur le processus global de sécrétion des protéines?

H. BIBLIOGRAPHIE

Achyuthan K, Greenberg E (1987) **Identification of a guanosine triphosphate-binding site on guinea pig liver transglutaminase. Role of GTP and calcium ions in modulating activity.** *J Biol Chem*, 262: 1901-1906

Al-Abed Y, Bucala R (2000) **Structure of a synthetic glucose derived advanced glycation endproduct that is immunologically cross-reactive with its naturally occurring counterparts.** *Bioconjugate Chem*, 11: 39-45

Agence de la Sante publique du Canada. http://www.phac-aspc.gc.ca/new_f.html

Ahmed N, Dobler D, Dean M, Thornalley PJ (2005) **Peptide mapping identifies hotspot site of modification in human serum albumin by methylglyoxal involved in ligand binding and esterase activity.** *J Biol Chem.*, 280: 5724-5732

Ahmed N, Thornalley PJ (2007) **Advanced glycation end products: what is their relevance to diabetic complications? Review Article.** *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 9 : 233-245

Ajiboye R, Harding JJ (1989) **The non-enzymic glycosylation of bovine lens proteins by glucosamine and its inhibition by aspirin, ibuprofen and glutathione.** *Exp Eye Res.*, 49: 31-41

Altmeyer A, Maki RG, Feldweg AM, Heike M, Protopopov VP, Masur SK, Srivastava PK (1996) **Tumor-specific cell surface expression of the KDEL containing, endoplasmic reticular heat shock protein gp96.** *Int J Cancer*, 69:340.

Andersson K, Buschard K, Fredman P (2002) **Patients with insulin-dependent diabetes but not those with non-insulin-dependent diabetes have anti-sulfatide antibodies as determined with a new ELISA assay.** *Autoimmunity* 35: 463-468

Antonetti D, Barber A, Hollinger L, Wolpert EB, Gardner T (1999) **Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden.** *J Biol Chem.*, 274: 23463-23467

- Augustin HG, Kozian DH, Johnson RC (1994) **Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes.** *Bioessays.*, 16: 901–906
- Avogaro A, Piarulli F, Valerio A (1997) **Forearm nitric oxide balance, vascular relaxation, and glucose metabolism in NIDDM patients.** *Diabetes*, 46: 1040-1046
- Bagai R, Valujskikh A, Canaday DH, Bailey E, Lalli PN, Harding CV, Heeger PS (2005) **Mouse endothelial cells cross-present lymphocyte-derived antigen on class I MHC via a TAP1- and proteasome-dependent pathway.** *J Immunol.*, 174: 7711- 7715
- Bagnall A, Webb D (2000) **The endothelin system: physiology.** In: *Vascular endothelium in human physiology and pathophysiology*, edited by P. Vallance and D. Webb. Amsterdam. Harwood academic publishers: 31-63
- Banks MA, Porter DW, Martin WG, Castranova V (1992) **Taurine protects against oxidant injury to rat alveolar pneumocytes.** In: J.B. Lombardini, S.W. Schaffer & J. Azuma (eds) *Taurine: Nutritional Value and Mechanisms of Action*, pp. 341–359, Plenum Press, New York and London
- Beck K, Hunter I, Engel J (1990) **Structure and function of laminin.** *FASEB J.*, 4: 148-160)
- Bendayan M (1980) **Use of the protein A-gold technique for the morphological study of vascular permeability.** *J Histochem Cytochem.*, 28: 1251-4
- Bendayan M (1985) **Alteration in the distribution of type IV collagen in glomerular basal laminae in diabetic rats as revealed by immunocytochemistry and morphological approach.** *Diabetologia*, 28: 373–78
- Bendayan M, Gingras D, Charest P (1986) **Distribution of endogenous albumin in the glomerular wall of streptozotocin-induced diabetic rats as revealed by high-resolution immunocytochemistry.** *Diabetologia*, 29: 868-875
- Bendayan M, Duhr MA, Gingras D (1986) **Studies on pancreatic acinar cells in tissue culture: basal lamina (basement membrane matrix promotes three-dimensional reorganization.** *Eur J Cell Biol.*, 42: 60-7

Bendayan M (1995) **Histones from diabetic rats contain increased levels of advanced glycation end products.** *Biochem Biophys Res Commun.*, 212: 56-62

Bendayan M, Rasio E (1996) **Transport of serum proteins, differing in molecular weight, through the vascular endothelium of the rete mirabile.** *J Histochem Cytochem.*, 39: 790

Bendayan M, Rasio E (1996) **Transport of insulin and albumin by the microvascular endothelium of the rete mirabile.** *J Cell Sci.*, 109: 1857-1864

Bendayan M, (1998) **Immunocytochemical detection of advanced glycated end products in rat renal tissue as function of age and diabetes.** *Kidney Int.*, 54: 438-447

Bendayan M (2002) **Morphological and cytochemical aspects of capillary permeability.** *Microsc Res Tech.*, 57: 327-49

Benhamou PY (1991) **Biochimie des Complications Vasculaires du Diabète.** Synthèse du 14ème Congrès de l'IDF, Washington DC, Juin 1991

Bernassola F, Federici M, Corazzari M, Terrinoni A, Hribal ML, De Laurenzi V, Ranalli M, Massa O, Sesti G, McLean WH, Citro G, Barbetti F, Melino G (2002) **Role of transglutaminase 2 in glucose tolerance: knockout mice studies and a putative mutation in a MODY patient.** *FASEB J*, 16: 1371-8

Benson TJ, Nerem RM, Pedley TJ (1980) **Assessment of wall shear stress in arteries, applied to the coronary circulation.** *Cardiovasc Res.*, 14: 568-576

Bevilacqua M, Nelson R (1993) **Endothelial-leukocyte adhesion molecules in inflammation and metastasis.** *Thromb Haemost.*, 70: 152-4

Beylot M, (1996) **Regulation of in vivo ketogenesis: role of free fatty acids and control by epinephrine, thyroid hormones, insulin and glucagon.** *Diabetes Metab*, 22: 299-304

Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) **Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA polyacrylamide gels.** *Electrophoresis*, 8: 93-99

Boldyrev AA, Formazyuk VE, Sergienko VI (1994) **Biological significance of histidine containing dipeptides with special reference to carnosine: chemistry, distribution, metabolism and medical application.** *SOV Sci Rev D Physicochem Biol.*, 13: 1–60

Booth AA, Khalifah RG, Tood P, Hudson BG (1997) **In vitro kinetic studies of formation of antigenic advanced glycation end products (AGEs) novel inhibition of post-Amadori glycation pathways.** *J Biol Chem*, 272: 5430-37

Boulangier E, Dequiedt P, Wautier JL (2002) **Advanced glycosylation end products (AGES): new toxins?** *Nephrologie*, 23: 351-9

Boyd-White J, Williams JC Jr. (1996) **Effect of cross-linking on matrix permeability. A model for AGE-modified basement membranes.** *Diabetes*, 45: 348-353

Brock JW, Cotham WE, Thorpe SR, Baynes JW, Ames JM (2007) **Detection and identification of arginine modifications on methylglyoxal-modified ribonuclease by mass spectrometric analysis.** *J Mass Spectrom.*, 42: 89-100

Brownlee M, Cerami A, Vlassara H (1988) **Advanced products of nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic vascular disease.** *Diabetes Metab Rev.*, 4: 437-51

Brownlee M (1992) **Nonenzymatic glycosylation of macromolecules. Prospects of pharmacologic modulation.** *Diabetes*, 41: 57-60

Brownlee M (2001) **Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications.** *Nature*, 414: 813–820

Bruns R, Palade G (1968) **Studies on blood capillaries. II. Transport of ferritin molecules across the wall of muscle capillaries.** *J Cell Biol.*, 37: 277-299

Bundgaard M, Frøkjaer-Jensen J, Crone C (1979) **Endothelial plasmalemmal vesicles as elements in a system of branching invaginations from the cell surface.** *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 6439-6442

- Buschard K, Blomqvist M, Osterbye T, Fredman P (2005) **Involvement of sulfatide in beta cells and type 1 and type 2 diabetes.** *Diabetologia*, 48: 1957-1962
- Cameron NE, Eaton SEM, Cotter MA, Tesfaye S (2001) **Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy.** *Diabetologia* 44: 1973–1988
- Caplice NM, Doyle B (2005) **Vascular progenitor cells: origin and mechanisms of mobilization, differentiation, integration, and vasculogenesis.** *Stem Cells Dev*, 14: 122-39
- Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, and Weiner CP (2000) **Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation.** *J. Cell Physiol.*, 184: 409-420
- Cerami C, Founds A, Nicholl I, Mitsuhashi T, Giordano D, Vanpatten S (1997) **Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products,** *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 13915–13920
- Cervantes-Laurean D, Roberts MJ, Jacobson E, Jacobson KM (2005) Nuclear proteasome activation and degradation of carboxymethylated histones in human keratinocytes following glyoxal treatment. *Free Radic Biol Med.*, 38: 786-95
- Cester N, Rabini RA, Salvolini E, Staffolani R, Curatola A, Pugnali A, Brunelli MA, Biagini G, Mazzanti L (1996) **Activation of endothelial cells during insulin-dependent diabetes mellitus: a biochemical and morphological study.** *Eur J Clin Invest.*, 26: 569-73.
- Chakravarthy U, Gardiner TA (1999) **Endothelium-derived agents in pericyte function/dysfunction.** *Prog Retin Eye Res.*, 18: 511-527.
- Chan B, Elices M, Murphy E, Hemler M (1992) **Adhesion to vascular cell adhesion molecule 1 and fibronectin. Comparison of alpha 4 beta 1 (VLA-4) and alpha 4 beta 7 on the human B cell line JY.** *J Biol Chem.*, 267: 8366-70
- Charfen MA, Frackelton MF (2005) **Diabetic Ketoacidosis.** *Emerg Med Clin N Am.*, 23: 609–628

Charonis AS, Reger LA, Dege IE, Kouzi-Koliakos K, Furcht LT, Wohlhueter RM, Tsilibary EC (1990) **Laminin alterations after in vitro nonenzymatic glycosylation.** *Diabetes*, 39: 807-14

Charonis AS, Tsilibary EC (1992) **Structural and functional changes of laminin and type IV collagen after nonenzymatic glycation.** *Diabetes*, 41 Suppl 2: 49-51

Chen H, Sato H, Totani T, Iwata H (2007) **Detection of insulin-releasing cells using in situ immunoblotting.** *Analytical Biochemistry*, 366: 137-143

Chevet E, Cameron PH, Pelletier MF, Thomas DY, Bergeron JJ (2001) **The endoplasmic reticulum: integration of protein folding, quality control, signaling and degradation.** *Curr Opin Struct Biol.*, 11: 120-4

Christiansen JS, Gammelgaard J, Frandsen M, Parving HH, (1981) **Increased kidney size, glomerular filtration rate and renal plasma flow in short-term insulindependent diabetics.** *Diabetologia*, 20: 451-456

Coleman MD (2000) **Use of *In Vitro* Methaemoglobin Generation to Study Antioxidant Status in the Diabetic Erythrocyte.** *Biochem Pharmac.*, 60: 1409-16

Crossman D, Tuddenham E (1990) **Procoagulant functions of endothelium.** In: *The Endothelium. An introduction to current research.* New York, 119-129

Cuisinier C, De Welle JM, Verbeeck RK (2002) **Role of taurine in osmoregulation during endurance exercise.** *Eur J Appl Physiol.*, 87: 489-495

Davey KA, Garlick PB, Warley A, Southworth R (2007) **Immunogold labeling study of the distribution of GLUT-1 and GLUT-4 in cardiac tissue following stimulation by insulin or ischemia.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 292: 2009-19

Davie EW (2003) **A brief historical review of the waterfall/cascade of blood coagulation.** *J Biol Chem.*, 278: 50819-32

Davies PF (1995) **Flow-mediated endothelial mechanotransduction.** *Physiol Rev.*, 75: 519-560

Day JF, Ingelbretsen CG, Ingelbretsen WR, Baynes J, Thorpe SR (1980) **Nonenzymatic glycosylation of serum proteins and hemoglobin: Response to changes in blood glucose levels in diabetic rats.** *Diabetes*, 29: 524-527

Defraigne JO (2005) **Un mecanisme physiopathologique central a l'origine des complications du diabete?** *Rev Med Liege*, 60: 472-478

Degenhardt TP, Alderson NL, Arrington DD (2002) **Pyridoxamine inhibits early renal disease and dyslipidemia in the streptozotocin-diabetic rat.** *Kidney Int.*, 61: 939-950

Delpierre F, Collard J, Fortpied E, Van Schaftingen (2002) **Fructosamine 3-kinase is involved in an intracellular deglycation pathway in human erythrocytes.** *Biochem J.*, 365: 801-808

Delpierre, Van Schaftingen (2003) **Fructosamine 3-kinase, an enzyme involved in protein deglycation.** *Biochem Soc Trans.*, 31: 1354-1357

Demine R, Walden P (2005) **Testing the role of gp 96 as peptide chaperone in antigen processing.** *The Journal of Biological Chemistry*, 18: 17573-78

Desjardins M, Benayan M (1989) **Ultrastructural distribution of endogenous IgGs in the glomerular wall of control and diabetic rats.** *Histochem J.*, 21: 731-742

Desjardins M, Bendayan M (1990) **Ultrastructural distribution of glomerular basement membrane components in experimental diabetes.** *Diabetes Res.*, 14: 65-73

Deuther-Conrad W, Loske C, Schinzel R, Dringen R, Riederer P, Munch G (2001) **Advanced glycation endproducts change glutathione redox status in SH-SY5Y human neuroblastoma cells by a hydrogen peroxide dependent mechanism.** *Neurosci Lett.*, 312: 29-32

Devaskar SU, De DeMello, (1996) **Cell-specific localization of glucose transporter proteins in mammalian lung.** *J. Clin Endocrinol. Metab.*, 81: 4373-4378

De Vriese, Verbeures AS, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM (2000) **Endothelial dysfunction in diabetes.** *Br J Pharmacol.*, 130: 963-974

Di Leo, MA, Santini SA, Cercone S (2002) **Chronic taurine supplementation ameliorates oxidative stress and Na (+) K (+) ATPase impairment in the retina of diabetic rats.** *Amino Acids*, 23: 401–406

Doucet M, Londono I, Gomez-Pascual A, Bendayan M (2000) **Glomerular basement membrane selective permeability in short-term streptozotocin-induced diabetic rats.** *Int J Exp Diabetes Res.*, 1: 19-30

Douglas B. Cines, Eleanor S. Pollak, Clayton A. Buck, Joseph Loscalzo, Guy A. Zimmerman, Rodger P. McEver, Jordan S. Pober, Timothy M. Wick, Barbara A. Konkle, Bradford S. Schwartz, Elliot S. Barnathan, Keith R. McCrae, Bruce A. Hug, Ann-Marie Schmidt, David M (1998) **Stern Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders.** *Blood*, 91: 3527-61

Du X, Matsumura T, Edelstein D, Rossetti L, Zsengellér Z, Szabó C, Brownlee M (2003) **Inhibition of GAPDH activity by poly (ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells.** *J Clin Invest.*, Oct 112: 986-8

Durieu-Trautmann O, Federici C, Creminon C, Foignant-Chaverot N, Roux F, Claire M, Strisberg AD, Couraud PO (1993) **Nitric oxide and endothelin secretion by brain microvessel endothelial cells: regulation by cyclic nucleotides.** *J Cell Physiol*, 155: 101-11

Dvornik D (1992) **Aldose reductase inhibitors as pathobiochemical probes.** *J Diabetes Complications*, 6: 25–34

Elices M, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyj S, Hemler M, Lobb R (1990) **VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site.** *Cell*, 60: 577-84

Engerman RL, Kern TS (1987) **Progression of incipient diabetic retinopathy during good glycemic control.** *Diabetes*, 36: 808-812

Etzioni A, Frydman M, Pollack S, Avidor I, Phillips ML (1992) **Brief report: recurrent severe infections caused by a novel leukocyte adhesion deficiency.** *N Engl J Med.*, 327: 1789–92

Farmer JG, Ulrich PC, Cerami A (1988) **Novel pyrroles from sulfite-inhibited Maillard reactions: insights into the mechanism of inhibition.** *J Org Chem.*, 53: 2346–49

Farrel CR, Boado RJ, Pardridge WM (1992) **Enhanced GLUT1 glucose transporter and cytoskeleton gene expression in cultured bovine brain capillary endothelial cells after treatment with phorbol esters and serum.** *Brain Res Mol.*, 15: 221-6

Féléto M, Vanhoutte PM (2000) **Endothelium-dependent hyperpolarization of vascular smooth muscle cells.** *Acta Pharmacol Sin.*, 21: 1-18

Fesus L, Piacentini M (2002) **Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions.** *Trends Biochem Sci.*, 27:534-539

Fischel-Ghodsian N (2001) **Mitochondrial DNA mutations and diabetes: another step toward individualized medicine.** *Ann intern Med.*, 1: 721-8

FitzGerald GA, Brash AR, Falardeau P, Oates JA (1981) **Estimated rate of prostacyclin secretion into the circulation normal man.** *J Clin Invest.*, 68: 1272-1275

Fleming I, Busse R (1999) **NO: the primary EDRF.** *J Mol Cell Cardiol.*, 31: 5-14

Fong DS, Aiello L, Gardner TW, King GL, Blankenship G, Cavallerano JD, Klein R (2004) **Retinopathy in diabetes.** *Diabetes Care.*, 27: S84-S87

Fra A, Williamson E, Simons K, Parton R (1994) **Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae.** *J Biol Chem.*, 69: 30745-8

Francisco GS, László V, Prakash J, Éva S, Jon GM, Lucas L, Anita M, Dale GH, Kanneganti G, Andrew LS, Garry JS, Csaba S (2001). **Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation.** *Nature Med.*, 7: 108-113

Franconi F, Bennardini F, Mattama A (1995) **Plasma and platelet taurine are reduced in subjects with insulindependent diabetes mellitus: effects of taurine supplementation.** *Am J Clin Nutr.*, 61: 1115–1119

Frokjaer-Jensen J (1980) **Three-dimensional organization of plasmalemmal vesicles in endothelial cells. An analysis by serial sectioning of frog mesenteric capillaries.** *J Ultrastruct Res.*, 73: 9-20

Frye EB, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW (1998) **Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins.** *J Biol Chem*, 273: 18714-19

Fuellekrug J, Soennichsen B, Wuensch U, Arseven K, Va Nguyen P, Soeling HD, Mieskes G (1994) **CaBP1, a calcium binding protein of the thioredoxin family, is a resident KDEL protein of the ER and not of the intermediate compartment.** *J Cell Sci.*, 107: 719-727

Fukui M, Nakamura T, Ebihara I, Shirato I, Tomino Y, Koide H (1992) **ECM gene expression and its modulation by insulin in diabetic rats.** *Diabetes*, 41: 1520-1527

Futter CE, White IJ (2007) **Annexins and endocytosis.** *Traffic*, 8: 951-8

Galzi JL, Changeux JP (1992) **Neurotransmitter-gated ion channels as unconventional allosteric proteins.** *Curr Op Struct Biol.*, 4: 554-565

Gao Y, Wang Y (2006) **Site-selective modifications of arginine residues in human hemoglobin induced by methylglyoxal.** *Biochemistry*, 45: 15654-60

Ghitescu L, Fixman A, Simionescu M, Simionescu N (1986) **Specific binding sites for albumin restricted to plasmalemmal vesicles of continuous capillary endothelium: receptor-mediated transcytosis.** *J Cell Biol.*, 102: 1304-1311

Ghitescu L, Galis Z, Simionescu M, Simionescu N (1988) **Differentiated uptake and transcytosis of albumin in successive vascular segments.** *J Submicrosc Cytol Pathol.*, 20: 657-69

Ghitescu L, Bendayan M (1992) **Transendothelial transport of serum albumin: a quantitative immunocytochemical study.** *J Cell Biol.*, 117: 745-755

Ghitescu L, Bendayan M (1992) **Hapten-tagged plasma proteins as immunocytochemical probes for the study of vascular permeability.** *Microsc Res Tech.*, 22: 392-401

Ghitescu L, Jacobson BS, Crine P (1999) **A novel, 85kDa endothelial antigen differentiates plasma membrane macrodomains in lung alveolar capillaries.** *Endothelium*, 6: 41-250

Ghitescu LD, Gugliucci A, Dumas F (2001) **Actin and annexins I and II are among the main endothelial plasmalemma-associated proteins forming early glucose adducts in experimental diabetes.** *Diabetes*, 50: 1666-1674

Giardino D, Edelstein, Brownlee M (1994) **Nonenzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity: A model for intracellular glycosylation in diabetes.** *J Clin Invest*, 94: 110-117

Gillard BK, Thomas J, Nell L, Marcus D (1989) **Antibodies against ganglioside in the sera of patients with type I diabetes mellitus.** *The Journal of Immunology*, 142: 3826-32

Gimbrone MA, Cotran RS, Folkman J (1974) **Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis.** *J Cell Biol.* 60: 673-80

Goodman HO, Shibabi Z (1990) **Supplemental taurine in diabetic rats: effects on plasma glucose and triglycerides.** *Biochem Med Metabol Biol.*, 43:1-9

Greene D, Lattimer S, Sima A (1988) **Are disturbances of sorbitol, phosphoinositide, and Na-K-ATPase regulation involved in pathogenesis of diabetic neuropathy?** *Diabetes*, 37: 688-693

Gugliano D, Paolisso G, Ceriello A (1996) **Oxidative stress and diabetic vascular complications.** *Diabetes Care.*, 19: 257-267.

Gugliucci A (1994) **Advanced glycation of rat liver histone octamers: an in vitro study.** *Biochem Biophys Res Commun.*, 203: 588-93

Gugliucci A, Bendayan M (1995) **Reaction of advanced glycation endproducts with renal tissue from normal and streptozotocin-induced diabetic rats: an ultrastructural study using colloidal gold cytochemistry.** *J Histochem Cytochem.*, 43: 591-600

Gugliucci A, Ghitescu L (2002) **Is diabetic hypercoagulability an acquired annexinopathy? Glycation of annexin II as a putative mechanism for impaired fibrinolysis in diabetic patients.** *Med Hypotheses*, 59: 247-51

Guthrow CE, Morris MA, Day JF, Thorpe SR, Baynes JW (1979) **Enhanced nonenzymatic glycosylation of human serum albumin in diabetic mellitus.** *Proc Natl Acad Sci.*, 76: 4248-4261

Haies DM, Gil J, Weibel ER (1981) **Morphometric study of rat lung cells. I. Numerical and dimensional characteristics of parenchymal cell population.** *Am Rev Respir Dis.*, 123: 533-541

Haitoglou CS Tsilibary EC Brownlee M Charonis AS (1992) **Altered cellular interactions between endothelial cells and nonenzymatically glycosylated laminin/type IV collagen.** *J Biol Chem.*, 267: 12404-7

Hart T, Pino R (1986) **Capillary permeability in the pancreas and colon: restriction of exogenous and endogenous molecules by fenestrated endothelia.** *Am J Anat Jan.*, 175: 49-58

Hashida R, Anamizu C, Kimura J, Ohkuma S, Yoshida Y, Takano T (1986) **Transcellular transport of lipoprotein through arterial endothelial cells in monolayer culture.** *Cell Struct Funct.*, 11: 31-46

Hayflick L (1965) **The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains.** *Exp Cell Res* 37: 614-636

Henle T, Miyata T (2003) **Advanced glycation end products in uremia.** *Adv Ren Repl Ther.*, 10: 321-331

- Hipkiss AR, Holliday R, McFarland GA, Michaelis J (1993) **Carnosine and senescence.** *Lifespan.*, 4: 1–3
- Hipkiss AR, Brownson C, Carrie CJ (2001) **Carnosine, the anti-ageing, anti-oxidant dipeptide, may react with protein carbonyl groups.** *Mech Ageing Dev.*, 122: 1431-45
- Hirsch B, Rösen P (1999) **Diabetes mellitus induces long lasting changes in the glucose transporter of rat heart endothelial cells.** *Horm Metab Res.*, 31: 645-652
- Hogikyan RV, Galecki AT, Pitt B, Halter JB, Greene DA, Supiano MK (1998) **Specific impairment of endothelium-dependent vasodilation in subjects with type 2 diabetes.** *J Clin Endocrinol Metab*, 83: 1946-1952
- Højlund K, Wrzesinski K, Larsen PM, Fey SJ, Roepstorff P, Handberg A, Dela F, Vinten J, McCormack J, Reynet C, Beck-Nielsen H (2003) **Proteome Analysis Reveals Phosphorylation of ATP Synthase β -Subunit in Human Skeletal Muscle and Proteins with Potential Roles in Type 2 Diabetes.** *J. Biol. Chem.*, 278: 10436-10442
- Horie K, Miyata T, Maeda K, Sugiyama S, Sakai H, van Ypersole de Strihou C, Monnier VM, Witztum JL, Kurokawa K (1997) **Immunohistochemical colocalization of glycoxidation products and lipid peroxidation products in diabetic renal glomerular lesions. Implication for glycoxidative stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy.** *J Clin Invest.*, 100: 2995-3004
- Horvat R, Palade G (1993) **Thrombomodulin and thrombin localization on the vascular endothelium: Their internalization and transcytosis by plasmalemmal vesicles.** *Eur J Cell Boil.*, 61: 299-313
- Hudson BI, Bucciarelli LG, Wendt C, Sakaguchi T, Lalla E, Qu W (2003) **Blockade of receptor for advanced glycation endproducts: a new target for therapeutic intervention in diabetic complications and inflammatory disorders.** *Arch Biochem Biophys*, 419: 80–88
- Huxtable RJ (1992) **Physiological actions of taurine.** *Physiol Rev.*, 75: 101–163
- Hynes RO (1992) **Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.** *Cell*, 69: 11-25

Ibii T, Shimada H, Miura S, Fukuma E, Sato H, Iwata H (2007) **Possibility of insulin-producing cells derived from mouse embryonic stem cells for diabetes treatment.** *J Biosci Bioeng.*, 103: 140-6

Idris I, Gray S, Donnelly R (2001) **Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes.** *Diabetologia*, 44: 659-73

Inoguchi T, Battan R, Handler E, Sportsman J, Heath W, King G (1992) **Preferential elevation of protein kinase C isoform α and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation.** *Proc Natl Acad Sci.*, 11059-11063

Inoue S, Bendayan M (1995) **High-resolution ultrastructural study of the rat glomerular basement membrane in long-term experimental diabetes.** *Ultrastruct Pathol.* 19 : 175-85

Irie S, Tavassoli M (1986) **Liver endothelium desialates ceruloplasmin.** *Biochem Biophys Res Commun.*, 140: 94-100

Ishii H, Koya D, King G (1998) **Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus.** *J Mol Med* 76: 21-31

Iwasaki Y, Kambayashi M, Asai M, Yoshida M, Nigawara T, Hashimoto K (2007) **High glucose alone, as well as in combination with proinflammatory cytokines, stimulates nuclear factor kappa-B-mediated transcription in hepatocytes in vitro.** *J Diabetes Complications*, 21: 56-62

Jain SK (1998) **Glutathione and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency can increase protein glycosylation.** *Free Radic Biol Med.*, 24: 197-201

Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR (1973) **Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: Identification by morphologic criteria.** *J Clin Invest*, 52: 2745-56

Jaffe E (1987) **Cell biology of endothelial cells.** *Hum Pathol.*, 18: 234-239

Jefferies W, Brandon M, Hunt S, Williams A, Gater K, Mason D (1984) **Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries.** *Nature (Lond)* 312: 162-163

Ji LL, Leeuwenburgh C, Leichtweis S, Gore M, Fiebig R, Hollander J, Bejma J (1998) **Oxidative stress and aging. Role of exercise and its influences on antioxidant systems.** *Ann NY Acad Sci.*, 854: 102–117

Johnson TS, El-Koraie AF, Skill NJ, Baddour NM, El Nahas AM, Njloma M, Adam AG, Griffin M (2003) **Tissue transglutaminase and the progression of human renal scarring.** *J Am Soc Nephrol.*, 14: 2052-62

Kador PF, Robison Jr WG, Kinoshita JH (1985) **The pharmacology of aldose reductase inhibitors.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 25: 691–714

Kahn BB (1992) **Facilitative glucose transporters: regulatory mechanisms and dysregulation in diabetes.** *J Clin Invest.*, 89: 1367–1374

Kalfa TA, Gerritsen ME, Carlson EC, Binstock AJ Tsilibary EC (1995) **Altered proliferation of retinal microvascular cells on glycated matrix.** *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 36: 2358-2367

Kanwar Y, Rosenzweig L, Linker A, Jakubowski M (1983) **Decreased de novo synthesis of glomerular proteoglycans in diabetes: biochemical and autoradiographic evidence.** *Proc Natl Acad Sci.*, 80: 2272-7

Karnovsky M (1967) **The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer.** *J Cell Biol* 35: 213-236

Kerfant BG, Vassort G, Gomez Am (2001) **Microtubule disruption by concichine reversibly enhances calcium signaling in intact rat cardiac myocytes.** *Circ. Res.*, 88: E59-E65

Kim I, Moon SO, Kim S, Kim H, Koh YS, Koh G (2001) **Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells.** *J Biol Chem* 276: 7614-20

Kim Y, Kleppel M, Butkowski R, Mauer S, Wieslander J, Michael A (1991). **Differential expression of basement membrane collagen chains in diabetic nephropathy.** *Am J Pathol.*, 138: 413-20

Kimmich G A, Carter-Su C, Randles J (1977) **Energetics of Na⁺-dependent sugar transport by isolated intestinal cells: evidence for a major role for membrane potentials.** *Am J Physiol.*, 233: 357-62

King G, Johnson S (1985) **Receptor-mediated transport of insulin across endothelial cells.** *Science*, 227: 1583-86

King RH (2001) **The role of glycation in the pathogenesis of diabetic polyneuropathy.** *J Clin Pathol Mol Pathol*, 54: 400–408

Kislinger T, Fu C, Huber B, Qu W, Taguchi A, Yan SD (1999) **N^ε-Carboxymethyllysine modifications of proteins are ligands for RAGE that activate cell signaling pathways and modulate gene expression.** *J Biol Chem*, 274: 31740–49

Knott RM, Robertson M, Muckersie E, Forrester JV (1996) **Regulation of glucose transporters (GLUT-1 and GLUT-3) in human retinal endothelial cells.** *Biochem J.*, 313-317

Kobayashi S, Nagase M, Honda N, Adachi K, Ichinose N, Hishida A (1989) **Analysis of anionic charge of the glomerular basement membrane in aminonucleoside nephrosis.** *Kidney Int.*, 35: 1405-8

Kowluru RA (2001) **Diabetes-induced elevations in retinal oxidative stress, protein kinase C and nitric oxide are interrelated.** *Acta Diabetol.*, 38: 179-85.

Kowluru RA, Tang J, Kern TS (2001) **Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experimental galactosemia. VII. Effect of long-term administration of antioxidants on the development of retinopathy.** *Diabetes*, 50: 938-1942

Kraegen EW, Sowden JA, Halstead MB, Clark PW, Rodnick KJ, Chisholm DJ, James DE (1993) **Glucose transporters and in vivo glucose uptake in skeletal and cardiac muscle: fasting, insulin stimulation and immunoisolation studies of GLUT1 and GLUT4.** *Biochem J.*, 295: 287–293

Kunisaki M, Bursell S, Umeda F, Nawata H, King G (1994) **Normalization of diacylglycerol-protein kinase C activation by vitamin E in aorta of diabetic rats and cultured rat smooth muscle cells exposed to elevated glucose levels.** *Diabetes*, 43:1372-1377

Laemmli UK (1970) **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature*, 227: 680-685

Lal S, Szwergold BS, Kappler F, Brown T (1993) **Detection of fructose-3-phosphokinase activity in intact mammalian lenses by ³¹P NMR spectroscopy.** *J Biol Chem.*, 268: 7763-7

Laliberté F, Sapin C, Belair MF, Druet P, Bariety J (1978) **The localization of the filtration barrier in normal rat glomeruli by ultrastructural immunoperoxidase techniques.** *Biol Cell.*, 31: 15

Lang GE (2007) **Treatment of diabetic retinopathy with protein kinase C subtype Beta inhibitor.** *Dev Ophthalmol*, 39: 157-65.

Lee AY, Chung SS (1999) **Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract.** *FASEB J*, 13: 23-30

Lee TS, Saltsman KA, Ohashi H, King GL (1989) **Activation of protein kinase C by elevation of glucose concentration: proposal for a mechanism in the development of diabetic vascular complications.** *Proc Natl Acad Sci.*, 86: 5141-5

Leitinger B, Hohenester E (2007) **Mammalian collagen receptors.** *Matrix Biol.*, 26: 146-155

Leutenegger M (1995) **Macroangiopathie diabétique, physiopathologie, implications thérapeutiques.** *Sang Thrombose Vaisseaux*, 7: 247-56

Ley K, Bullard DC, Arbones ML, Bosse R, Vestweber D, Tedder TF, Beaudet AL (1995) **Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo.** *J Exp Med.*, 181: 669-75

Li Z, Srivastava PK (1993) **Tumor rejection antigen gp96/grp94 is an ATPase: implications for protein folding and antigen presentation.** *EMBO J.*, 12: 3143–3151

Ling X, Sakashita N, Takeya M, Nagai R, Horiuchi S, Takahashi K(1998) **Immunohistochemical distribution and subcellular localization of three distinct specific molecular structures of advanced glycation end products in human tissues.** *Lab Invest.*, 78: 1591–1606

Linskens MH, Harley CB, West MD, Campisi J, Hayflick L (1995) **Replicative senescence and cell death.** *Science* 267: 17-20

Londoño I, Ghitescu L, Bendayan M (1995) **Glomerular handling of glycated albumin in the normal mouse kidney.** *Am J Physiol.*, 268: F913-F921

Londoño I, Bendayan M (2001) **Temporary effects of circulating Amadori products on glomerular filtration properties in the normal mouse.** *Am J physiol Renal Physiol.*, 280: 103-11

Luft J (1966) **Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red.** *Fed Proc.*, 25: 1773-83

Luo ZJ, King RH, Lewin J, Thomas PK (2002) **Effects of nonenzymatic glycosylation of extracellular matrix components on cell survival and sensory neurite extension in cell culture.** *J Neurol.*, 249: 424-431

Luscher T (1990) **Endothelial control of vascular tone and growth.** *Clin Exp Hypertens.*, 12: 897-902

Makino H, Shikata K, Hironaka K, Kushiro M, Yamasaki Y, Sugimoto H, Ota Z, Araki N, Horiuchi S (1995) **Ultrastructure of nonenzymatically glycated mesangial matrix in diabetic nephropathy.** *Kidney Int.*, 48: 517-526

Malek AM, Alper SL, Izumo S (1999) **Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis.** *JAMA*, 282: 2035–2042

Marré M (1997) **Paroi vasculaire et diabete: quelles complications et pourquoi ?** *Therapie* 52: 371-374

Mauer S, Steffes M, Ellis E, Sutherland D, Brown D, Goetz F (1984) **Structural-functional relationships in diabetic nephropathy.** *J Clin Invest.*, 74: 1143-55

McCance DR, Dyer D, Dunn JA, Bailie KE, Thorpe SR, Baynes JW (1993) **Maillard reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus.** *J Clin Invest.*, 91: 2470-2478.

McEver RP (2002) **Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow.** *Curr Opin Cell Biol.*, 14: 581-586

McFarland GA, Holliday R (1994) **Retardation of the senescence of cultured human fibroblasts by carnosine.** *Exp Cell Res.*, 212: 167-175

Meister A, Anderson ME (1983) **Glutathione.** *Annu Rev Biochem.*, 52: 711-760

Melino G, Bernassola F, Knight R, Corasaniti M, Nisticò G, Finazzi-Agro A (1997) **S nitrosylation regulates apoptosis.** *Nature (London)* 388: 432-433

Meng J, Sakata N, Takebayashi S, Asano T, Futata T, Araki N, Horiuchi S (1996) **Advanced glycation end products of the Maillard reaction in aortic pepsin-insoluble and pepsin-soluble collagen from diabetic rats.** *Diabetes*, 45: 1037-1043.

Miao D, Yu L, Eisenbarth GS (2007) **Role of autoantibodies in type 1 diabetes.** *Front Biosci.*, 12: 1889-1898

Michel CC, Curry FE (1999) **Microvascular permeability.** *Physiol Rev.*, 79: 703-61

Milici A, Furie M, Carley W (1985) **The formation of fenestrations and channels by capillary endothelium in vitro.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 6181-5

Mishra S, Murphy LJ (2004) **Phosphorylation of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 by breast cancer cell membranes enhances IGF-I binding.** *Endocrinology*, 145: 213

Miura J, Yamagishi S, Uchigata Y, Takeuchi M, Yamamoto H, Makita Z (2003) **Serum levels of non-carboxymethyllysine advanced glycation endproducts are correlated to severity of microvascular complications in patients with type 1 diabetes.** *J Diabetes Complications*, 17: 16–21

Miyata T, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K, Baynes JW (1999) **Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: origin and significance of "carbonyl stress" in long-term uremic complications.***Kidney Int*, 55: 389-399

Monnier V, in: Baynes JW, Monnier VM (1988) **The Maillard reaction in aging, diabetes and nutrition.** Allan R Liss, NY: 1-22

Monnier V (1993) **Non-enzymatic glycosylation of proteins. Complications of diabetes mellitus, aging and kidney failure.** *Presse Med.*, 22: 1413-8

Monnier VM, Nagaraj RH, Portero-Otin M, Glomb M, Elgawish AH, Sell DR, Friedlander MA (1996) **Structure of advanced Maillard reaction products and their pathological role.** *Nephrol Dial Transplant*, 11(S5): 20-26

Moriya T, Nakazawa K, Itoh N, Shigematsu H, Okada N, Aizawa T, Yamada T, Yajima Y (1993) **Loss of glomerular anionic sites and the development of albuminuria in rats with streptozotocin-induced diabetes.** *Nephron*, 65: 444-8

Moss S, Klein R, Klein B (1998) **The 14-year incidence of visual loss in a diabetic population.** *Ophthalmology*, 105: 998–1003

Mostov KE, Simister NE (1985) **Tranicytosis.** *Cell.*, 43: 89-90

Moutzuris DA, Kitsiou PV, Talamagas AA, Drossopoulou GI, Kassimatis TI, Katsilambros NK (2007) **Chronic exposure of human glomerular epithelial cells to high glucose concentration results in modulation of high-affinity glucose transporters expression.** *Ren Fail.*, 29: 353-8

Muir A, Schatz D, Maclaren N (1992) **The pathogenesis, prediction, and prevention of insulin-dependent diabetes mellitus.** *J Clin North Am.*, 21: 199-219

Muller AM, Hermanns MI, Cronen C, Kirkpatrick CJ (2002) **Comparative study of adhesion molecule expression in cultured human macro- and microvascular endothelial cells.** *Exp Mol Pathol.*, 73: 171-80

Multhoff G, Botzler C, Jennen L, Schmid J, Ellwart J, Issels RD (1997) **Heat shock protein 72 on tumor cells. A recognition structure for natural killer cells.** *J Immunol*, 158: 4341

Nagai R, Matsumoto K, Ling X, Suzuki H, Araki T, Horiuchi S (2000) **Glycoaldehyde, a reactive intermediate for advanced glycation end products, plays an important role in the generation of an active ligand for the macrophage scavenger receptor.** *Diabetes*, 49: 1714-1723

Nagaraj RH, Sarkar P, Mally A, Biemel KM, Lederer MO, Padayatti PS (2002) **Effect of pyridoxamine on chemical modification of proteins by carbonyls in diabetic rats: characterization of a major product from the reaction of pyridoxamine and methylglyoxal.** *Arch Biochem Biophys.*, 402: 110-119

Nakamura N, Hasegawa G, Obayashi H, Yamazaki M, Ogata M, Nakano K, Yoshikawa T, Watanabe A, Kinoshita S, Fujinami A, Ohta M, Imamura Y, Ikeda T (2003) **Increased concentration of pentosidine, an advanced glycation end product, and interleukin-6 in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy.** *Diabetes Res Clin Pract.*, 61: 93–101.

Nakamura Y, Kawakami M, Yoshihiro A (2002) **Involvement of the mitochondrial death pathway in chemopreventive benzyl isothiocyanate-induced apoptosis.** *J Biol Chem.*, 277: 8492–8499

Nakaoka H, Perez D , Baek KJ , Das T , Husain A, Misono K, Im MJ, Graham RM, (1994) **Gh: a GTP-binding protein with transglutaminase activity and receptor signaling function.** *Science*, 364: 1593-1596

Nandhini A, Anuradha CV (2003) **Inhibition of lipid peroxidation, protein glycation and elevation of membrane ion pump activity by taurine in RBC exposed to high glucose.** *Clin Chim Acta.*, 336: 129–135

Naruse K, King G (2001) **Effect of diabetes on endothelial function.** *Diabetes and cardiovascular disease* edited by M. Johnstone and A. Veves. New Jersey. Humana Press. pp. 45-65

Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M (2000) **Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage.** *Nature*, 404: 787-90

Nguyen S, Pascariu M, Ghitescu L (2006) **Early glycation products of endothelial plasma membrane proteins in experimental diabetes.** *Bioch et Bioph Acta*, 1762: 94-102

Obayashi H, Nakano K, Shigeta H, Yamaguchi M, Yoshimori K, Fukui M (1996) **Formation of crossline as a fluorescent advanced glycation endproduct in vitro and in vivo.** *Biochem Biophys Res Commun*, 226: 37-41

Obrosova IG, Fathallah L, Stevens MJ (2001) **Taurine counteracts oxidative stress and nerve growth factor deficit in early experimental diabetic neuropathy.** *Exp Neurol.*, 172: 211-219

O'Farrel PH (1975) **High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.** *J Biol Che*, 250: 4007-21

Ono K, Iwanaga Y, Hirayama M, Kawamura T, Sowa N, Hasegawa K (2004) **Contribution of caveolin-1 alpha and Akt to TNF-alpha-induced cell death.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 287: 201-209

Oztürk G, Sekeroğlu MR, Erdoğan E, Oztürk M (2006) **The effect of non-enzymatic glycation of extracellular matrix proteins on axonal regeneration in vitro.** *Acta Neuropathol.*, 112: 627-632

Palmer R, Ferrige A, Moncada S (1987) **Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.** *Nature*, 327: 524-6

Pascariu M, Bendayan M, Ghitescu L (2004) **Correlated Endothelial Caveolin Overexpression and Increased Transcytosis in Experimental Diabetes** *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 52: 65-76

Parthasarathy N, Spiro R (1982) **Effect of diabetes on the glycosaminoglycan component of the human glomerular basement membrane.** *Diabetes* 31: 738-41

Pirart J (1977) **Diabete et complications degeneratives. Présentation d'une étude prospective portant sur 4400 cas observes entre 1947 et 1973.** *Diabete Metab.*, 3: 97-107

Petersen, Szwegold BS, Kappler F, Weingarten M, Brown T (1990) **Identification of sorbitol 3-phosphate and fructose 3-phosphate in normal and diabetic human erythrocytes.** *J Biol Chem.*, 265:17424–17427

Pfeifer MA, Schumer MP, Gelber DA (1997) **Aldose reductase inhibitors: the end of an era or the need for different trial designs?** *Diabetes*, 46: S82–S89

Popov D, Sima A, Stern D, Simionescu M (1996) **The pathomorphological alterations of endocardial endothelium in experimental diabetes and diabetes associated with hyperlipidemia.** *Acta Diabetol.*, 33: 41-7

Portero – Otin M, Pamplona R, Ruiz MC, Cabisco E, Prat J, Bellmunt MJ (1999) **Diabetes induces an impairment in the proteolytic activity against oxidized proteins and a heterogeneous effect in nonenzymatic protein modifications in the cytosol of rat liver and kidney.** *Diabetes*, 48: 2215-20

Powers SK, Lennon SL (1999) **Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle.** *Proc Nutr Soc.*, 58: 1025–1033

Predescu D, Palade G (1993) **Plasmalemmal vesicles represent the large pore system of continuous microvascular endothelium.** *Am J Physiol.*, 265: H725-33

Predescu D, Horvat R, Predescu S, Palade G (1994) **Transcytosis in the continuous endothelium of the myocardial microvasculature is inhibited by N-ethylmaleimide.** *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 3014-3018

Predescu D, Predescu S, McQuistan T, Palade G (1998) **Transcytosis of alpha 1-acidic glycoprotein in the continuous microvascular endothelium.** *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6175-6180

Predescu S, Predescu D, Palade G (2001). **Endothelial transcytotic machinery involves supramolecular protein- lipid complexes.** *Mol Biol Cell* 12: 1019-1033

Rabilloud T, Valette C, Lawrence J (1994) **Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension.** *Electrophoresis*, 15: 1552-8

Radomski M, Palmer R, Moncada S (1987) **Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium.** *Lancet*, 2: 1057-1058

Ramamurthy A, Daniel Jones, Larsson L (2003) **Glutathione reverses early effects of glycation on myosin function.** *Am J Physiol Cell Physiol.*, 285: C419-C424

Reddy S, Bichler J, Wells-Knecht KJ, Thorpe SR, Baynes J (1995) **N^{ϵ} -(Carboxymethyl)lysine is a dominant advanced glycation endproduct (AGE) in tissue proteins.** *Biochemistry*, 34: 10872-10878.

Regina A, Koman A, Piciotti M, El Hafny B, Center Ms, Bergmann R, Couraud PO, Roux F (1998) **Mrp1 multidrug resistance-associated protein and P-glycoprotein expression in rat brain microvessel endothelial cells.** *J Neurochem*, 71: 705-15

Risau W (1997) **Mechanism of angiogenesis.** *Nature*, 386: 671-674

Roberts RL, Sandra A (1993) **Apical-basal membrane polarity of membrane phosphatases in isolated capillary endothelium: alteration in ultrastructural localisation under culture conditions.** *J Anat.*, 182: 339-47

Rogers KS, Higgins ES, Kline ES (1986) **Experimental diabetes causes mitochondrial loss and cytoplasmic enrichment of pyridoxal-phosphate and aspartate-aminotransferase activity.** *Biochem Med Metab Biol.*, 36: 91-97

Rohrbach DH, Hassell JR, Kleinman HK, Martin GR (1982) **Alterations in the basement membrane (heparan sulfate) proteoglycan in diabetic mice.** *Diabetes*, 2: 185-8

Rohrbach R (1986) **Reduced content and abnormal distribution of anionic sites (acid proteoglycans) in the diabetic glomerular basement membrane.** *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.*, 51: 127-35

Roux F, Durieu-Trautmann PO, Chaverot N, Claire M, Mailly P, Bourne JM, Strosberg AD, Couraud PO (1994) **Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline**

phosphatase activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. *J Cell Physiol*, 159: 101-13

Roy S, Maiello M, Lorenzi M (1994) **Increased expression of basement membrane collagen in human diabetic retinopathy.** *J Clin Invest.*, 93: 438-42

Sakurai T, Asakura T, Mizuno A, Matsuda M (1992) **Absorption and metabolism of pyridoxamine in mice.2. Transformation of pyridoxamine to pyridoxal in intestinal tissues.** *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 38: 227-233

Schaffer W, Weissmann C (1973) **A rapid, sensitive and specific method for the determination of protein in dilute solution.** *Anal Biochem*, 56: 502-514

Schubert W, Frank P, Razani B, Park D, Chow C, Lisanti M (2001) **Caveolae-deficient Endothelial Cells Show Defects in the Uptake and Transport of Albumin *in vivo*.** *J. Biol. Chem* 276: 48619-48622

Schubert W, Frank PG, Woodman SE, Hyogo H, Cohen DE, Chow CW, Lisanti MP (2002) **Microvascular hyperpermeability in caveolin-1 (-/-) knock-out mice. Treatment with a specific nitric-oxide synthase inhibitor, L-name, restores normal microvascular permeability in Cav-1 null mice.** *J Biol Chem* 277: 40091-8

Sell D, Monnier V (1998) **Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix: implication of pentoses in the aging process.** *J Biol Chem.*, 264: 21597-21602

Setter SM, Campbell RK, Cahoon CJ (2003) **Biochemical Pathways for Microvascular Complications of Diabetes Mellitus.** *The Annals of Pharmacotherapy*, 37: 1858-66

Sharma NK, Gardiner TA, Archer DB (1985) **A morphologic and autoradiographic study of cell death and regeneration in the retinal microvasculature of normal and diabetic rats.** *Am J Ophthalmol* 100: 51-60

Shasby D, Lind S, Shasby S, Goldsmith J, Hunninghake G (1985) **Reversible oxidant-induced increases in albumin transfer across cultured endothelium: alterations in cell shape and calcium homeostasis.** *Blood*, 65: 605-14

Shaul P, Anderson R (1998) **Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction.** *Am J Physiol.*, 275: L843-851

Shiels H, A O'Connell, MA Qureshi, FC Howarth, E White, S. Calaghan (2007) **Stable microtubules contribute to cardiac dysfunction in the streptozotocin-induced model of type 1 diabetes in the rat.** *Mol Cell Biochem.*, 294: 173-180

Shimaoka M, Springer TA (2003) **Therapeutic antagonists and the conformational regulation of integrin structure and function.** *Nature Rev Drug Discover.*, 2: 703-716

Shimokawa H (1999) **Primary endothelial dysfunction. Atherosclerosis.** *JMol Cell Cardiol*, 31: 23-37

Shimomura H, Spiro R (1987) **Studies on macromolecular components of human glomerular basement membrane and alterations in diabetes. Decreased levels of heparan sulfate proteoglycan and laminin** *Diabetes*, 36: 374-81

Siflinger-Birnboim A, Lum H, Del Vecchio P, Malik A (1996) **Involvement of Ca²⁺ in the H₂O₂-induced increase in endothelial permeability.** *Am J Physiol* 270: L973-L978

Simionescu M, Simionescu N, Silbert J, Palade G (1981) **Differentiated microdomains on the luminal surface of the capillary endothelium. I Partial characterisation of their anionic sites.** *J Cell Biol.*, 90: 614-621

Simionescu M, Simionescu N, Palade GE (1982) **Preferential Distribution of Anionic Sites on the Basement Membrane and the Abluminal Aspect of the Endothelium in Fenestrated Capillaries.** *The Journal of Cell Biology*, 95: 425-434

Simionescu M, Simionescu N (1984) **Ultrastructure of microvascular wall: functional correlations.** In: *Handbook of Physiology*, edited by E M Renkin, CC Michel, SR Geiger. Washington, DC: Am Physiol Soc, sect.2, vol IV, chapt. 3: 41-101

Simionescu M, Simionescu N (1986) **Receptor-mediated transcytosis of plasma molecules by vascular endothelium.** *Ann Rev Physiol.*, 48: 279-293

Simionescu M, Simionescu N (1988) In: *Endothelial cell biology in health and disease.* New York: Plenum Press

Simionescu M, Simionescu N (1991) **Endothelial transport of macromolecules: transcytosis and endocytosis. A look from cell biology.** *Cell Biol Rev.*, 25: 1-80

Simionescu M, Gafencu A, Antohe F (2002) **Transcytosis of plasma macromolecules in endothelial cells: a cell biological survey.** *Microsc Res Tech.*, 57: 269-88

Simionescu N, Simionescu M, Palade G (1978) **Open junctions in the endothelium of the postcapillary venules of the diaphragm.** *J Cell Biol.*, 79: 27-44

Simionescu N, Simionescu M, Palade G (1978) **Structural basis of permeability in sequential segments of the microvasculature.** *Microvasc Res.*, 15: 1-16

Simionescu N (1979a) **The microvascular endothelium: Segmental differentiations, transcytosis, selective distribution of anionic sites.** *Advances in inflammation research*, 1: 61-70.

Simionescu N (1979b) **The microvascular endothelium: Segmental differentiations, transcytosis, selective distribution of anionic sites.** In: *Advances in inflammation research*, vol. 1, edited by: G Weissman, B Samuelson, R Paoletti. New York. Raven Press: 61-70

Simionescu N (1983) **Cellular aspects of transcapillary exchange.** *Physiol Rev.*, 63:1536-1579

Singh-Jasuja H, Toes RE, Spee P, Münz C, Hilf N, Schoenberger SP, Ricciardi-Castagnoli P, Neefjes J, Rammensee HG, Arnold-Schild D, Schild H (2000) **Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis.** *J Exp Med.*, 191: 1965-74

Sing R, Barden A, Mori T, Beilin L (2001) **Advanced glycation end products: a review.** *Diabetologia*, 44: 129-146

Smart E, Graf G, McNiven M, Sessa W, Enelman J, Scherer P, Okamoto T, Lisanti M (1999) **Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction.** *Mol Cell Biol.*, 19: 7289-7304

Smith MA, Taneda S, Richey S, Miyata S, Yan D, Stern D (1994) **Advanced Maillard reaction products are associated with Alzheimer disease pathology.** *Proc Natl Acad Sci*, 91: 5710

Smyth LA, Herrera OB, Golshayan D, Lombardi G, Lechler RI (2006) **A novel pathway of antigen presentation by dendritic and endothelial cells: Implications for allorecognition and infectious diseases.** *Transplantation*, 82: S15-18

Soda R, Tavassoli M (1984) **Transendothelial transport (transcytosis) of iron-transferrin complex in the blood marrow.** *J Ultrastruct Res.*, 88: 18-29

Soltau JB, Zhou XL, McLaughlin BJ (1993) **Isolation of Plasma Membrane Domains from Bovine Corneal Endothelial Cells.** *Exp Eye Res.*, 56: 115-120

Springer TA (1995) **Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration.** *Annu Rev Physiol.*, 57: 827-72

Stan R, Ghitescu L, Jacobson B, Palade G (1999) **Isolation, cloning, and localization of rat PV-1, a novel endothelial caveolar protein.** *J Cell Biol.*, 145: 1189-1198

Stan R, Kubitza M, Palade G (1999) **PV-1 is a component of stomatal and fenestral diaphragms in fenestrated endothelia.** *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13203-13207

Stan R (2002) **Structure and function of endothelial caveolae.** *Microsc Res Tech.*, 57: 350-64

Stegenga ME, van der Crabben SN, Levi M, de Vos A F, Tanck MW, Sauerwein HP, van der Poll T (2006) **Hyperglycemia Stimulates Coagulation, Whereas Hyperinsulinemia Impairs Fibrinolysis in Healthy Humans.** *Diabetes*, 55: 1807-1812

Stehouwer C, Lambert J, Donker AJ, van Hinsbergh V (1997) **Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy.** *Cardiovasc Res.*, 34: 55-68

Stern DM, Yan SD, Yan SF, Schmidt AM (2002) **Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and the complications of diabetes.** *Age Res Rev*, 1: 1-15

Stolz DB, Jacobson BS (1992) **Examination of transcellular membrane protein polarity of bovine aortic endothelial cells in vitro using the cationic colloidal silica microbead membrane-isolation procedure.** *J Cell Sci.*, 103: 39-51

Szwegold BS, Howell S, Beisswenger S (2001) **Human fructosamine-3-kinase: purification, sequencing, substrate specificity, and evidence of activity in vivo.** *Diabetes*, 50: 2139–2147

Szwegold BS (2005) **Intrinsic toxicity of glucose, due to non-enzymatic glycation, is controlled in-vivo by deglycation systems including: FN3K-mediated deglycation of fructosamines and transglycation of aldosamines.** *Med Hypotheses*, 65: 337-48

Szwegold BS (2007) **Fructosamine-6-phosphates are deglycated by phosphorylation to fructosamine-3, 6-bisphosphates catalyzed by fructosamine-3-kinase (FN3K) and/or fructosamine-3-kinase-related-protein (FN3KRP).** *Med Hypotheses*, 68: 37–45

Takemoto M, Asker N, Gerhardt H, Lundkvist A, Johansson R, Saito Y, Betsholtz C (2002) **A new method for large scale isolation of kidney glomeruli from mice, American Journal of Pathology.** *The American Journal of Path*, 161: 799-805

Tamsma J, van den Born J, Bruijn J, Assmann K, Weening J, Berden J, Wieslander J, Schrama E, Hermans J, Veerkamp J (1994) **Expression of glomerular extracellular matrix components in human diabetic nephropathy: decrease of heparan sulphate in the glomerular basement membrane.** *Diabetologia*, 37: 313-20

Tarsio JF, Reger LA, Furcht LT (1988) **Molecular mechanisms in basement membrane complications of diabetes. Alterations in heparin, laminin, and type IV collagen association.** *Diabetes*, 37: 532-539

Tedder T, Steeber D, Chen A, Engel P (1995) **The selectins: vascular adhesion molecules.** *FASEB J.*, 9: 866-73

Tessari P, Puricelli L, Iori E, Arrigoni G, Vedovato M, James P, Coracina A, Millioni R (2007) **Altered chaperone and protein turnover regulators expression in cultured skin fibroblasts from type 1 diabetes mellitus with nephropathy.** *J Proteome Res.*, 6: 976-86

Tewes BJ, Galla HJ (2001) **Lipid polarity in brain capillary endothelial cells.** *Endothelium*, 8: 207-220

The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy. (2000) *N Engl J Med.*, 342: 381-389

Tilton RG, Kawamura T, Chang K, Ido Y, Bjerkce R, Stephan C, Brock T, Williamson J (1997) **Vascular dysfunction induced by elevated glucose levels in rats is mediated by vascular endothelial growth factor.** *J Clin Invest.*, 99: 2192-2202

Tilton RG (2002) **Diabetic vascular dysfunction: links to glucose-induced reductive stress and VEGF.** *Microsc Res Tech.*, 57: 390-407

Ting HH, Timimi FK, Boles KS, Creager SJ, Ganz P, Creager MA (1996) **Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus.** *J Clin Invest.*, 97: 22-28

Tooke JE, Brash PD (1996) **Microvascular aspects of diabetic foot disease.** *Diabet Med.*, 13: S26-29

Tortora G, Grabowski S (1993) **L'appareil cardio-vasculaire.** In: *Principes d'anatomie et de Physiologie* Traduction par P Mathieu et F Galau. Montréal, Centre Educatif et Culturel Inc chap.20: 625-629

Totary-Jain H, Naveh-Many T, Riahi Y, Kaiser N, Eckel J, Sasson S (2005) **Calreticulin destabilizes glucose transporter-1 mRNA in vascular endothelial and smooth muscle cells under high-glucose conditions.** *Circ Res*, 97: 1001-8

Trachtman H, Del Pizzo R, Futterweit S (1992) **Taurine attenuates renal disease in chronic puromycin aminonucleoside nephropathy.** *Am J Physiol.*, 262: F117-F123

Tsai SC, Burnakis TG (1993) **Aldose reductase inhibitors.** *Ann Pharmacother*, 27: 751-54

Tsai TH, Kimura Y, Okazaki R (2000) **Close relationship of abnormal glucose tolerance with endothelial dysfunction in hypertension.** *Hypertension*, 36: 245-249

Turko IV, Murad F (2003) **Quantitative protein profiling in heart mitochondria from diabetic rats.** *J Biol Chem.*, 278(37): 35844-9

Udenfriend S, Stein S, Böhlen P, Dairman W, Leimgruber W, Weigele M (1972) **Fluorescamine: A reagent for assay of amino acids, peptides, proteins and primary amines in the picomole range.** *Science*, 178: 871–872

UKPDS (1998) **Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes: UKPDS 33.** *Lancet* 352: 837–851

Urade R, Kito M (1992) **Inhibition by acidic phospholipids of protein degradation by ER60 protease, a novel cysteine protease, of endoplasmic reticulum.** *FEBS Letters* 312: 8386

Vaisman N, Gospodarowicz D, Neufeld G (1990) **Characterization of the receptors for vascular endothelial growth factor.** *J Biol Chem.*, 265: 19461-6

Van Boekel MA, Hoenders HJ (1992) **In vivo glycation of bovine lens crystallins.** *Biochem Biophys Acta.*, 1159: 92-102

Vasile E, Simionescu N (1985) In: *Glomerular dysfunction and biopathology of vascular wall*, edited by Copley AL, Hamashima Y, Seno S et Ventachalam MA. Tokyo. Academic Press: 87-101

Veiga Da-Cunha M, Jacquemin P, Delpierre G, Godfraind C, Théate I, Vertommen D, Clotman F, Lemaigre F, Devuyst O, Van Scaftingen E (2006) **Increased protein glycation in fructosamine 3-kinase-deficient mice.** *Biochem J.*, 15: 257-264

Virgintino D, Robertson D, Benagiano V, Errede M, Bertossi M, Ambrosi G, Roncali L (2000) **Immunogold cytochemistry of the blood-brain barrier glucose transporter GLUT1 and endogenous albumin in the developing human brain.** *Brain Res Dev Brain res.*, 123: 95-101

Voziyan PA, Khalifah RG, Thibaudeau C, Yildiz A, Jacob J, Serianni AS, Hudson BG (2003) **Modification of proteins In vitro by physiological levels of glucose: Pyridoxamine inhibits conversion of amadori intermediate to advanced glycation end-products through binding of redox metal ions.** *J Biol Chem.*, 10: 1074

Wa C, Cerny RL, Clarke WA, Hage DS (2007) **Characterization of glycation adducts on human serum albumin by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.** *Clin Chim Acta.*, Epub ahead of print

Wagner R, Chen S (1991) **Transcapillary transport of solute by the endothelial vesicular system: evidence from thin serial section analysis.** *Microvasc Res.*, 42: 139-150

Wang Q, Doerschuk CM (2001) **The p38 mitogen-activated protein kinase mediates cytoskeletal remodeling in pulmonary microvascular endothelial cells upon intracellular adhesion molecule-1 ligation.** *J Immunol.*, 166: 6877-6884

Wautier JL, Guillausseau PJ (1998) **Diabetes, advanced glycation endproducts and vascular disease.** *Vasc Med.*, 3: 131-137.

Way KJ, Katai N, King GL (2001) **Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications.** *Diabet Med.*, 18: 945-59

Weinbaum S, Tsay R, Curry FE (1992) **A three-dimensional junction-pore-matrix model for capillary permeability.** *Microvasc Res.*, 44: 85-111

Wiberg C, Klatt AR, Wagener R, Paulsson M, Bateman JF, Heinegård D, Mörgelin M (2003) **Complexes of matrilin-1 and biglycan or decorin connect collagen VI microfibrils to both collagen II and aggrecan.** *J Biol Chem.*, 278: 37698-37704

Vehkavaara S, Seppälä-Lindroos A, Westerbacka J, Groop PH, Yki-Järvinen H (1999) **In vivo endothelial dysfunction characterizes patients with impaired fasting glucose.** *Diabetes Care*, 22: 2055-2060.

Wiemer G, Scholkens BA, Becker RH, Busse R (1991) **Ramiprilat enhances endothelial autacoid formation by inhibiting breakdown of endothelium-derived bradykinin.** *Hypertension*, 18: 558-63

Williams B, Gallacher B, Patel H, Orme C (1997) **Glucose-induced protein kinase C activation regulates vascular permeability factor mRNA expression and peptide production by human vascular smooth muscle cells in vitro.** *Diabetes* 46: 1497-1503

Williams MD, Nadler JL (2007) **Inflammatory mechanisms of diabetic complications.** *Curent Diabetes Reports*, 7: 242-248

Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y, Kawamura T, Nyengaard JR, van den Enden M, Kilo C, Tilton RG (1993) **Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications.** *Diabetes*, 42: 801-813

Wilson PWF, Anderson KM, Kannel WB (1986) **Epidemiology of diabetes mellitus in the elderly.** *Am J Med.*, 80 (Suppl 5A): 3-9

Wolff SP, Dean RT (1987) **Glucose autoxidation and protein modification: the potential role of "autoxidative glycosylation" in diabetes mellitus.** *Biochem J*, 245: 243-50

Wolf G, Haberstroh U, Neilson EG (1992) **Angiotensin II Stimulates the Proliferation and Biosynthesis of Type I Collagen in Cultured Murine Mesangial Cells.** *American Journal of Pathology*, 140 : 255-69

Wolf G (2005) **Mecanismes moleculaires de l'atteinte renale d'origine diabetique** http://www.soc-nephrologie.org/PDF/enephro/publications/actualites/2005/2005_16.pdf

Xia P, Kramer RM, King GL, (1995) **Identification of the mechanism for the inhibition of Na,K-adenosine triphosphatase by hyperglycemia involving activation of protein kinase C and cytosolic phospholipase A2.** *J Clin Invest.*, 96: 733-740

Yamagishi S, Imaizumi T (2005) **Diabetic vascular complications: pathophysiology, biochemical basis and potential therapeutic strategy.** *Curr Pharm Des.*, 11: 2277-2287

Yan H, Harding JJ (1999) **Inactivation and loss of antigenicity of esterase by sugars and a steroid.** *Biochim Biophys Acta*, 1454: 183-90.

Yan S, Schmidt A, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS (1994) **Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation endproducts with their receptors/binding proteins.** *J Biol Chem*, 269: 9889-9897.

Yuan Y, Granger H, Zawieja D, DeFily D, Chilian W (1993) **Histamine increases venular permeability via a phospholipase C-NO synthase-guanylate cyclase cascade.** *Am J Physiol.*, 264: H1734-H1739

Ziyadeh F (1995) **Mediators of hyperglycemia and the pathogenesis of matrix accumulation in diabetic renal disease.** *Miner Electrolyte Metab.*, 21: 292-302