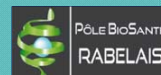




RD-Néphrologie

# CALCIFICATION AORTIQUE EX VIVO : SUSCEPTIBILITE EN FONCTION DU DEREGLLEMENT GLUCIDIQUE CHEZ LE RAT

N. Gayraud, C. Guzman, M. Tournier, S. Rebuffat, R. Gomis, A-D Lajoix, A. Argilès, S. Péraldi-Roux, B. Jover  
RD-Néphrologie et EA7288, Université Montpellier I, Montpellier, FRANCE.  
Nathalie.gayraud@inserm.fr



## INTRODUCTION

La calcification vasculaire est fréquemment observée dans le diabète et dans le syndrome métabolique. Elle est associée à un risque accru d'accidents cardio-vasculaires. La prévention et le traitement des complications liées à ces pathologies sont directement liées à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans ces atteintes. La résistance à l'insuline, l'obésité et l'inflammation seraient des facteurs favorisant la calcification vasculaire. Le but de ce travail préliminaire a été de comparer la calcification vasculaire d'anneaux aortiques cultivés ex vivo issus de différents modèles animaux ayant un métabolisme glucidique altéré.

## MATERIELS ET METHODES

La capacité à calcifier est évaluée ex-vivo sur des anneaux aortiques de rats dont le métabolisme glucidique est altéré. L'aorte thoracique est prélevée sur des rats insulino-résistants (Zucker de 10 semaines, ZDF de 6 semaines et rats « cafétéria ») ou sur des rats diabétiques ZDF de 13 semaines. Des rats Wistar et Zucker fa/+ servent de témoins. Douze anneaux de chaque aorte sont cultivés 14 jours dans un milieu calcifiant (3,8mM de phosphate) ou un milieu contrôle. Le dosage du calcium est réalisé à partir du tissu sec avec un kit colorimétrique et exprimé en mg/g d'aorte. La localisation du calcium et de la fibrose respectivement par coloration au von Kossa et au rouge sirius est réalisée sur coupes histologiques (3-5µm) après inclusion en paraffine. Une quantification est réalisée en pourcentage de l'aire de section.

## RESULTATS

Nous avons comparé la calcification d'anneaux aortiques en culture de rats insulino-résistants (Zucker de 10 semaines, ZDF de 6 semaines et rats « cafétéria ») ou sur des rats diabétiques ZDF de 13 semaines. Des rats Wistar et Zucker fa/+ servent de témoins (Table 1). 10 semaines, ZDF de 6 semaines et rats « cafétéria » ou sur des rats diabétiques ZDF de 13 semaines. Des rats Wistar et Zucker fa/+ servent de témoins (Table 1). Dans les différents groupes de rats, aucune calcification n'est observée avec le milieu contrôle négatif. Le phosphate entraîne une calcification dans tous les groupes (Figure 1). Elle est significativement plus forte dans les groupes insulino-résistants Zucker et ZDF de 6 semaines (878±141 et 871±60 mg/g) comparée au Wistar (300±89 mg/g) mais pas au rat Zucker fa/+ (670±80 mg/g). Elle est majorée chez le ZDF diabétique âgé de 13 semaines (1390±64 mg/g). Elle est la plus forte chez les rats « cafétéria » (1659±129 mg/g).

	Wistar	Lean	Zucker	ZDF 10 sem	ZDF 13 sem	Cafétéria
Poids final g	277±4	299±3	652±19	334±5	323±8	640±69
Glycémie g/L	0,84±0,08	0,84±0,01	1,87±0,39	1,45±0,08	2,30±0,44	1,21±0,17
Insulinémie µg/mL	1,19±0,10	1,87±0,59	10,6±2,3	5,34±0,76	3,31±0,83	1,45±0,19
HOMA IR	1,05±0,10	1,25±0,92	20,88±0,35	12,74±0,24	8,02±0,18	1,65±0,18

Table 1. Paramètres sanguins et poids des rats

Au niveau histologique, la coloration von Kossa de l'aire de la section aortique montre que la calcification est la plus importante chez les rats cafétérias (23%), elle est également augmentée mais plus modérément dans les groupes insulino-résistants Zucker et ZDF de 6 semaines (14 et 13%). Ces résultats sont en accord avec la quantification de la calcification par dosage colorimétrique des anneaux aortiques. Pour les rats diabétiques de 13 semaines, il est observé une calcification aortique beaucoup moins importante (4%) que celle déterminée par dosage (Figure 2).

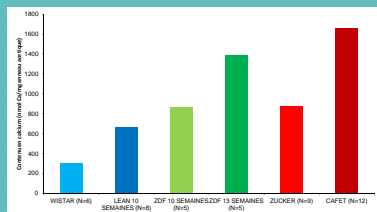


Figure 1. Quantification du contenu en calcium des aortes des différents groupes de rats par dosage colorimétrique.

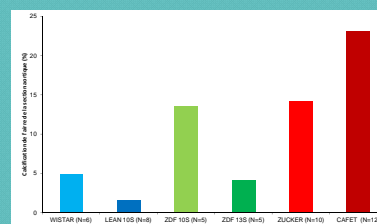


Figure 2. Quantification de la calcification par coloration von Kossa sur coupes aortiques de 5µm des différents groupes rats.

La figure 3 représente la répartition de la calcification dans l'adventice et la média des aortes. Les groupes témoins ne présentent pas de calcification de l'adventice, dans les groupes insulino-résistants Zucker et ZDF de 6 semaines elle est majoritairement dans la média (81 et 69%), chez les ZDF 13 semaines la calcification est mise en évidence plutôt dans l'adventice (71%) et chez les rats cafétérias elle est répartie de façon égale dans l'adventice et la média.

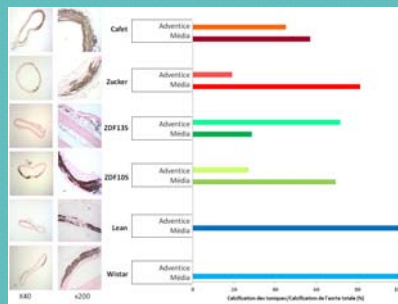


Figure 3. Localisation de la calcification par coloration von Kossa sur coupes aortiques de 5µm des différents groupes de rats.

La coloration au rouge sirius révèle une accumulation de collagènes localisée au niveau du dépôt calcifique (Figure 4).



Figure 4. Marquage de la fibrose au rouge sirius. La répartition des collagènes est similaire au marquage de la calcification par le von Kossa.

## CONCLUSION

La calcification vasculaire de gros troncs artériels est exacerbée en présence d'une dysfonction métabolique, et la différence de localisation chez les différents groupes de rats suggère l'existence de mécanismes différents selon le modèle étudié. Les rats insulino-résistants Zucker et ZDF 6 semaines ont un profil similaire avec une forte calcification de la média, les rats diabétiques (ZDF 13 semaines) présentent une calcification plutôt adventicielle et les rats cafétérias ont une calcification qui se répartie sur les deux tuniques, média et adventice.

L'altération du métabolisme glucidique, en particulier l'hyperglycémie induit une altération des tissus et stimule un certain nombre de voies = activation de la réponse inflammatoire par les produits terminaux de glycation (AGEs), augmentation du stress oxydant par activation de la voie des polyols, diminution de l'oxyde nitrique (vasodilatateur) et augmentation de l'endothéline-1 (vasoconstricteur) par activation de la voie de la protéine kinase C et activation de la voie des hexosamines se traduisant par une surexpression du TGF bêta et de l'inhibiteur de type 1 des activateurs du plasminogène. De nombreuses études épidémiologiques et cliniques sur le diabète ont également montré une augmentation de l'ostéoprotégérine (OPG) circulante corrélée avec une calcification artérielle suggérant un rôle du système ostéoprotégérine/RANKL (remodelage osseux) dans la calcification vasculaire chez les patients diabétiques. L'étude de l'activation de ces voies dans la paroi vasculaire des différents modèles permettra de mieux comprendre et d'identifier les mécanismes impliqués dans la mise en place de la calcification vasculaire dans ces pathologies.