

Inhibition du développement de l'immuno-artériosclérose par la calcitonine

par L. ROBERT, Dominique BRECHEMIER, G. GODEAU, Marie-Louise LABAT *
G. MILHAUD *

*Laboratoire de Biochimie du Tissu conjonctif, Faculté de Médecine,
Université Paris XII (ER CNRS 53), Institut de recherche
sur les Maladies vasculaires, 6, rue du Général Sarrail
94000 Créteil*

* *Service de Biophysique, CHU Saint-Antoine, 75012 Paris.*

Summary. *Calcitonin inhibition of the development of immun-arteriosclerosis.*

Typical sclerotic lesions in the rabbit aorta can be induced by immunisation with K-elastin. These lesions include fragmentation of the elastic fibers and diffuse calcium deposition accompanied by an increase of the 5 M-guanidinium Cl-soluble structural glycoprotein-containing fraction of the media and an increase of the hydroxyproline (collagen) content of the 1 M MgCl₂ soluble aorta extract and guanidinium soluble hydroxyproline (polymeric collagen).

In animals treated simultaneously with calcitonin, the morphological, and most of the biochemical, modifications produced by K-elastin immunisation were absent.

Calcitonin administration abolished the increase of the guanidinium soluble protein fraction and of the glycoprotein increase in the MgCl₂ and guanidinium extracts.

The distribution of the calcium salts in the aorta extracts was also modified by calcitonin administration ; the calcium content of the MgCl₂ and guanidinium extracts decreased and that of the final residue (elastin) increased.

These results indicate that calcitonin influences the biosynthetic activity of the smooth muscle cells of the media and exerts a protective action against the biochemical and morphological modification produced by immun-arteriosclerosis.

Introduction.

Les lésions artérielles de type athéromateux se calcifient fréquemment aussi bien chez l'homme que chez l'animal expérimental (Lansing, 1959 ; Ouzilou *et al.*, 1973 ; Robert, Kadar et Robert, 1974 ; Robert *et al.*, 1971).

En plus des dépôts calciques macroscopiquement apparents, on a pu mettre en évidence une fixation diffuse du calcium dans l'élastine et qui augmente avec l'âge indépendamment de l'artériosclérose qui est un phénomène localisé (Lansing, 1959). Les travaux récents (Urry, 1974 ; Urry *et al.*, 1976) ont permis de confirmer la forma-

tion de complexes entre les chaînes peptidiques et l'élastine et le calcium et proposer ainsi une explication à l'augmentation diffuse du calcium dans les grosses artères.

Les facteurs influençant ces dépôts sont encore mal connus bien que les glycoprotéines acides pourraient intervenir comme sites de nucléation (Gotte *et al.*, 1963 ; Robert *et al.*, 1971). Il est possible de créer des lésions artérielles chez le lapin par immunisation avec de l'élastine soluble (K-élastine) (Robert et Poullain, 1963) provenant d'aorte de porc soumise à une « dissection chimique » (Moczar et Robert, 1970). On peut remarquer par examen macroscopique et histologique la fragmentation et la dégradation des fibres élastiques, accompagnée d'une dégénérescence cellulaire et de nombreux dépôts calciques intra et extra cellulaires (Robert *et al.*, 1971). Ces lésions rappellent à la fois des dépôts diffus constatés au cours du vieillissement et les lésions décrites dans l'artériosclérose avancée.

Il semblait intéressant d'étudier des substances capables d'influencer le métabolisme calcique pouvant ainsi modifier l'affinité du calcium pour le tissu mésenchymateux. L'hormone de choix fut la calcitonine qui possède une action hypocalcémiante et paraît capable d'influencer le métabolisme du calcium au niveau cellulaire (Milhaud *et al.*, 1975). Nous avons pu montrer récemment qu'un traitement simultané avec la calcitonine des lapins immunisés avec la K-élastine les protège contre l'artériosclérose (Robert *et al.*, 1977). Nous résumerons ci-dessous ces résultats.

Matériel et méthodes.

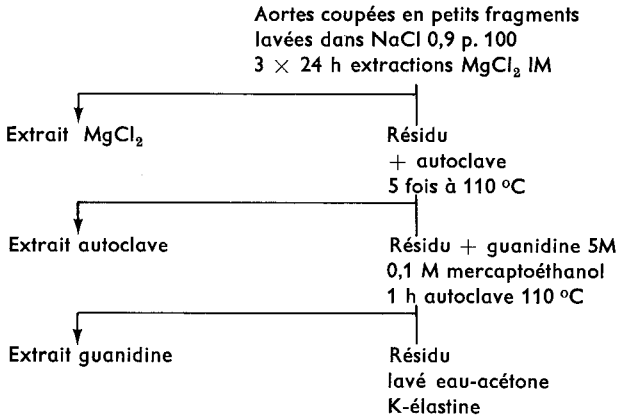
Le tableau 1 indique le protocole de l'expérience. Des lapins d'une souche sanguine (¹) âgés de deux mois ont été utilisés. A la fin de l'expérience, les animaux sont sacrifiés et les aortes sont examinées macroscopiquement, histologiquement, puis soumises à une extraction chimique (Robert *et al.*, 1977) (fig. 1).

TABLEAU 1

Protocole des expériences

Groupe	Nombre d'animaux	Traitement (durée 1 mois)
I	4	Contrôle recevant un régime normal du commerce (UAR 112)
II	10	Injection IM de 5 mg de K-elastine 2 fois par semaine dans de l'adjuvant complet de Freund
III	8	Même traitement que groupe II avec 2 fois par jour injection IM de 0,16 UMRC de calcitonine de porc purifiée (Roussel-Uclaf)
IV	6	Injection de calcitonine 2 fois par jour comme pour groupe III

(¹) Service du Professeur Theret, Ecole nationale vétérinaire, 7 avenue du Général de Gaulle, 94701 Maisons-Alfort.

FIG. 1. — *Protocole d'extraction chimique.*

Résultats.

Le tableau 2 montre l'intensité des lésions (évaluée macroscopiquement notée par des croix de X à XXXX) ainsi que la valeur moyenne des lésions (nombre moyen de croix) pour les quatre groupes d'animaux (voir tabl. 1). Comme le montre le tableau 2, l'immunisation avec la K-élastine induit régulièrement des lésions calcifiées

TABLEAU 2

*Observation macroscopique des aortes des 4 groupes de lapins **

Groupe I		Groupe II		Groupe III		Groupe IV	
N° lapin	lésion	N° lapin	lésion	N° lapin	lésion	N° lapin	lésion
74	×	91	××××	49	××	79	××
57	××	81	××	23	×	59	×
85	× (×)	73	××	35	× (×)	60	0
33	××	41	×××	30	0	66	×××
		42	×××	25	0	68	×××
		72	×××	31	××	62	××
		71	×××	36	×		
		70	×××	24	×		
				21	×		
				34	×		
1.7		Valeur moyenne des lésions 3.0		1.1		1.6	

* Reproduit de Robert *et al.* (1971).

de l'aorte chez le lapin. Le traitement simultané des animaux avec la calcitonine a empêché le développement de ces lésions. Il en est de même en ce qui concerne les modifications biochimiques provoquées par l'immunisation avec la K-élastine (tabl. 3). L'immunisation provoque une augmentation de la teneur en collagène (hydroxyproline) des extraits $MgCl_2$ et guanidine (glycoprotéines de structure). Ces modifications ne sont pas observées chez les animaux traités simultanément avec la calcitonine. Le traitement avec la calcitonine seule produit par contre une baisse de la teneur en élastine de la paroi.

La distribution du calcium dans les extraits macromoléculaires est aussi modifiée par l'administration de calcitonine (tabl. 4) : la teneur en calcium de l'élastine aug-

TABLEAU 3

Composition des aortes de lapins

Protéines (mg/g de poids frais) et hydroxyproline (mg p. 100 protéines).
Moyennes \pm écart type par rapport aux témoins.

Groupe	Traitement	Extrait	Protéine	Hydroxyproline
I	témoin	$MgCl_2$	32,7 \pm 7,7	0,45 \pm 0,15
		Guanidine	5,5 \pm 4,0	1,20 \pm 0,87
		Résidu	5,9	0,84
II	K-élastine	$MgCl_2$	30,7 \pm 8,6	1,60 \pm 0,22 *
		Guanidine	8,4 \pm 2,09	2,6 \pm 0,85 *
		Résidu	3,33 \pm 1,09	0,64
III	K-élastine + Calcitonine	$MgCl_2$	29,0 \pm 10	0,75 \pm 0,28 *
		Guanidine	2,95 \pm 0,65	0,60 \pm 0,28 *
		Résidu	2,66 \pm 0,90	1,40
IV	Calcitonine	$MgCl_2$	25,8 \pm 7,0	0,60 \pm 0,35
		Guanidine	3,0 \pm 0,4	1,2 \pm 0,4
		Résidu	1,98 \pm 0,70 *	0,76

* Valeurs significativement différentes ($0,05 > p > 0,001$).

TABLEAU 4

Teneur en calcium des extraits d'aorte des lapins des groupes II et III

Groupes	Extrait $MgCl_2$	Extrait guanid.	Résidu final (élastine)	Teneur globale
II K-élastine + calcitonine	3,33 \pm 0,38	3,83 \pm 0,53	3,96 \pm 0,62	11,12
III K-élastine	2,84 \pm 0,66 *	2,87 \pm 0,60 *	5,89 \pm 0,89 *	11,60

* Valeurs significativement différentes ($0,05 > p > 0,001$).

mente et celle des extraits $MgCl_2$ et guanidine diminue. Bien que la teneur totale en calcium ne semble pas varier, la réaction de Van Kossa est négative, ou beaucoup moins fortement positive, dans les aortes du groupe III (traitées par la calcitonine) que dans les aortes du groupe II (immunisées avec la K-élastine).

Discussion et conclusions.

Les résultats biochimiques et histologiques de cette première expérience laissent à penser que la calcitonine pourrait agir sur la paroi artérielle la rendant moins susceptible aux altérations produites par l'immunisation avec la K-élastine. Ce traitement engendre des modifications pathologiques et chimiques semblables à celles rencontrées au cours de l'athérosclérose humaine (Ouzilou *et al.*, 1973). Les dépôts calcaires se constituent dans l'intima et dans la média, dans les cellules et dans la matrice. Les fibres du collagène et de l'élastine paraissent fixer le calcium d'après nos études histochimiques et électromicroscopiques (Robert *et al.*, 1971). Ces altérations n'ont pas été constatées chez les lapins immunisés et traités simultanément par la calcitonine. Le dosage de la calcémie après l'injection de la calcitonine a révélé une baisse transitoire du taux de calcium. Néanmoins, la calcémie contrôlée tout le long de l'expérience n'a pas varié chez les lapins d'une façon significative. Il semble donc que l'action de la calcitonine s'exerce plutôt au niveau des cellules de la paroi : cellules endothéliales et cellules musculaires lisses en modifiant leur susceptibilité aux modifications produites par l'immunisation sur la Kappa-élastine. Comme d'autre part, nous avons pu mettre en évidence des autoanticorps anti-élastine chez l'homme (Robert et Robert, 1969). On pourrait envisager une action protectrice de cette hormone sur la paroi artérielle contre l'action sclérogène des facteurs auto-immuns.

Cependant, le traitement avec la calcitonine seule apporte aussi des modifications dans la composition de la paroi, telles qu'une augmentation de la fraction du calcium total fixé dans l'élastine.

Ces résultats suggèrent un rôle régulateur possible pour la calcitonine dans le métabolisme de la paroi artérielle et permet d'envisager l'utilisation de cette hormone pour le traitement de l'artériosclérose.

Réunion Groupe Développement INRA/Productions animales
Montpellier, 17-18 mai 1977.

Références

- GOTTE L., SERAFINI-FRACASSINI A., MOUL V., 1963. The chemical composition of the NaCl soluble fraction from autoclaved elastin. *Atherosclerosis*, **3**, 244-251.
- LANSING A. I., 1959. *Arterial wall*. William-Wilkins, N. Y., Baltimore.
- MILHAUD G., TALBOT J. N., COUTRIS G., 1975. Traitement de l'ostéoporose post-ménopausique par la calcitonine ; évaluation de l'efficacité. *Biomédecine*, **22**, 223-232.
- MOCZAR M., ROBERT L., 1970. Extraction and fractionation of the media of the thoracic aorta. Isolation and characterization of structural glycoproteins. *Atherosclerosis*, **11**, 7-26.
- OUZILOU J., ROBERT A. M., ROBERT L., BOUISSOU H., PIERAGGI M. T., 1973. Etude sur la composition de la paroi artérielle normale et athéroscléreuse. *Paroi artérielle*, **1**, 105-111.

- ROBERT A. M., GROSGOGEAT Y., REVERDY V., ROBERT B., ROBERT L., 1971. Lésions artérielles produites chez le lapin par immunisation avec l'élastine et les glycoprotéines de structure de l'aorte. Etudes biochimiques et morphologiques. *Atherosclerosis*, **13**, 427-449.
- ROBERT B., ROBERT A. M., 1969. Mécanismes immunologiques dans l'artériosclérose. *Méd. Hyg.*, **27**, 822-824.
- ROBERT L., BRECHEMIER D., GODEAU G., LABAT M. T., MILHAUD G., 1977. Prevention of experimental immun-arteriosclerosis by calcitonin. *Biochem. Pharmacol*, **26**, 2129-2135.
- ROBERT L., GROSGOGEAT Y., ROBERT A. M., ROBERT B., 1971. Mechanism of calcification of elastic tissue. Induction of a typical arteriosclerotic lesion by immunisation of rabbits with purified elastin. *Israël J. Med. Sci.*, **7**, 431-432.
- ROBERT L., KADAR A., ROBERT B., 1974. The macromolecules of the intercellular matrix of the arterial wall : collagen, elastin, proteoglycans and glycoproteins, 85-123. In WAGNER W. D. CLARKSON T. B. *Arterial mesenchyme and arteriosclerosis*. Plenum Press, New-York.
- ROBERT L., POUILLAIN N., 1963. Etudes sur la structure de l'élastine et le mode d'action de l'élastase. I. Nouvelle méthode de préparation de dérivés solubles de l'élastine. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **45**, 1317-1326.
- URRY D. W. 1974. Studies on the conformation and interaction of elastin, 211-243. In WAGNER W. D. CLARKSON T. B. *Arterial mesenchyme and arteriosclerosis*. Plenum Press, New-York.
- URRY D. W., LONG M. M., HENDRIX C. F., OKAMOTO K., 1976. Cross linked polypentapeptide of tropoelastin ; an insoluble serum calcifiable matrix. *Biochemistry*, **15**, 4089-4093.
-