

50376
1977
45

LABORATOIRE DE BIOCHIMIE DU TISSU CONJONCTIF
UNIVERSITÉ PARIS-VAL DE MARNE

50376
1977
45

ÉTUDES BIOCHIMIQUES
SUR L'ÉLASTINE ET LES ÉLASTASES
A L'ÉTAT NORMAL ET PATHOLOGIQUE

Ladislav ROBERT



ETUDES BIOCHIMIQUES SUR L'ELASTINE ET LES ELASTASES

A L'ETAT NORMAL ET PATHOLOGIQUE

LADISLAS ROBERT

TABLE DES MATIERES

	Page
I. INTRODUCTION.....	1
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	12
III. RÉSULTATS.....	21
A - PROPRIETES PHYSICOCHEMICHES DE L'ELASTINE. ROLE DES INTERACTIONS HYDROPHOBES.....	23
1 - Introduction : hydrolyse acide et alcaline de l'élastine ; rôle des forces hydrophobes.....	23
2 - Mise en évidence d'interactions hydrophobes dans l'élastine par l'étude de l'hydrolyse alcaline en milieu aqueux-organique.....	26
3 - Elasticité entropique de l'élastine.....	31
4 - Interaction lipides-élastine.....	34
a) Expériences in vivo.....	34
b) Lipides associés avec l'élastine dans l'aorte humaine.....	35
5 - Conclusions.....	39
B - STRUCTURE DE L'ELASTINE ET MODE D'ACTION DES ELAS- TASES.....	41
1 - Adsorption de l'élastase sur l'élastine.....	41
2 - Cinétique de l'hydrolyse de l'élastine.....	45
3 - Interprétation de la phase de latence.....	46

4 -	Thermodynamique de l'action élastine-élastase	48
5 -	Mesure de la vitesse de diffusion de l'élastase d'une fibre d'élastine à l'autre.....	49
6 -	Elastases cellulaires et tissulaires.....	52
	a) Mise en évidence, purification et propriétés d'une élastase plaquettaire.....	53
	b) Propriétés de l'élastase artérielle.....	57
	c) Elastase artérielle en fonction de l'âge et de l'athérome.....	59
	d) Conclusions.....	59
C -	LE ROLE DES GLYCOPROTEINS DE STRUCTURE DANS LA BIOSYNTHESE DE L'ELASTINE.....	62
1 -	Introduction.....	62
2 -	Séparation des composants glycoprotidiques de l'élastine.....	64
3 -	Les glycoprotéines de structure du tissu élastique.....	66
4 -	Morphologie des glycoprotéines extraites de l'aorte (glycoprotéines de structure) et de l'élastine purifiée.....	69
5 -	Conclusions.....	71
D -	MODIFICATION DE L'ELASTINE AU COURS DU VIEILLISSEMENT ET DE L'ATHERO-ARTERIOSCLEROSE.....	74
1 -	Introduction.....	74
2 -	Biosynthèse de l'élastine en fonction de l'âge chez le lapin. Etude en culture d'organe.....	75
3 -	Modification de l'élastine au cours de l'athéro-artériosclérose.....	83
	Introduction.....	83

a) Accélération du catabolisme de l'élastine avec l'âge et au cours de la maladie artérielle.....	83
b) Modification du "programme" de synthèse des macromolécules à la suite d'interaction entre les cellules musculaires lisses et les lipoprotéines sériques...	85
c) Interaction entre les éléments circulants et la paroi artérielle.....	87
4 - Antigénicité de l'élastine. Son rôle dans l'athérogénèse.....	88
5 - Effet de la calcitonine sur l'immuno-artériosclérose provoquée par la κ -élastine.....	90
DISCUSSION.....	92
CONCLUSIONS.....	102

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au C.N.R.S grâce auquel il m'a été possible de mener une carrière de chercheur et qui m'a ainsi permis de réaliser les expériences décrites dans cette thèse. Je remercie également les organismes suivants qui, par leurs subventions, ont soutenu d'une façon continue les efforts de notre laboratoire : D.G.R.S.T. (ACC Biologie et Pathologie de la Paroi Artérielle), I.N.S.E.R.M. (contrats libres, ATP Vieillesse et Thrombose), D.R.M.E., Fondation pour la Recherche Médicale Française et Caisse Nationale d'Assurance Maladie.

I - INTRODUCTION

L'élastine est une protéine fibreuse du tissu conjonctif, connue depuis longtemps mais qui n'a fait l'objet d'investigations biochimiques systématiques que depuis une décennie environ. Beaucoup moins répandue que le collagène, elle forme, avec celui-ci, la charpente protidique fibreuse du tissu conjonctif. Avec les protéoglycannes et les glycoprotéines de structure, ces 4 macromolécules constituent la matrice intercellulaire des organismes pluricellulaires. En ce qui concerne l'historique de l'élastine, les articles de HASS (1), GROSS (2), DEMPSEY et LANSING (3), FELCHER (4), HALL (5, 6, 7), PARTRIDGE (8-11) et de AYER (12) peuvent être consultés. Selon HASS (1) c'est FLEMMING, en 1759, qui aurait, pour la première fois, reconnu l'élasticité du type caoutchouteux du système vasculaire et HOLLENBERG, en 1836, aurait réussi la première fois à isoler, à l'état plus ou moins purifié, les fibres élastiques à partir des parois vasculaires en utilisant l'eau bouillante pour éliminer le collagène. Mais, l'individualisation de l'élastine date de l'ère histochimique et c'est UNNA, en 1896, qui aurait réussi le premier à mettre en évidence et à individualiser les fibres élastiques dans la paroi vasculaire.

I - INTRODUCTION

en utilisant des colorants spécifiques comme l'orcéine, le colorant de WEIGERT et certains autres colorants. Déjà, au cours du XIXe siècle, CHITTENDEN et HART (1887), puis RICHARDS et GIES (1902) ont reconnu la coacervation réversible par la chaleur des hydrolysats d'élastine : un précipité se forme pendant le chauffage de la solution aqueuse qui se redissout en refroidissant (voir 12).

La composition très particulière en acides aminés de l'élastine a été pour la première fois déterminée par STEIN et MILLER en 1938, mais c'est surtout les travaux de PARTRIDGE, commencés au cours des années 50, qui ont conduit à nos connaissances actuelles de la composition et de la structure de l'élastine. C'est au cours d'un travail de longue haleine entrepris avec THOMAS qu'il a réussi à isoler la desmosine et l'iso-desmosine, acides aminés caractéristiques de l'élastine et qui lui confèrent sa propriété d'élasticité du type caoutchouteux, grâce à l'établissement des liaisons pontiques entre les molécules ("monomères") individuelles. Cette nécessité de pontage a été reconnue par PARTRIDGE par analogie entre l'élasticité et la vulcanisation du caoutchouc. Les études thermodynamiques de FLORY ont montré que l'élastine, comme le caoutchouc, possède une élasticité du type entropique. Or, dans le caoutchouc, les liaisons pontiques sont nécessaires pour son élasticité. PARTRIDGE en a déduit qu'il doit en être de même pour l'élastine et a réussi à identifier ces liaisons pontiques avec la desmosine et l'isodesmosine. Certains autres acides aminés intercaténaux,

comme la lysino-norleucine et la merodesmosine, peuvent se trouver sur les voies métaboliques conduisant de la lysine à la desmosine.

L'isolement, au cours des dernières années, de la tropoélastine, par l'équipe de CARNES et SANDBERG, à partir d'aortes de porcs élevés sur un régime exempt de cuivre, a permis enfin d'entreprendre l'étude du précurseur soluble de l'élastine polymérique (13, 14). La tropoélastine serait, pour les fibres élastiques, ce qu'est le tropocollagène pour les fibres de collagène.

L'élastine est donc l'une des protéines les plus "originales" de l'organisme des vertébrés. Son apparition phylogénétique est assez récente et, de toute façon, beaucoup plus récente que celle du collagène, des protéoglycannes, voire des glycoprotéines de structure. L'élastine est donc probablement la plus "jeune" des macromolécules de la matrice intercellulaire (MMI). Le collagène et les glycoprotéines de structure sont certainement présents chez les premiers métazoaires, les éponges. L'élastine n'apparaît avec certitude que chez des invertébrés "supérieurs" tels que la seiche (15).

Les données histologiques de certains auteurs suggèrent la présence de protéines analogues dans quelques invertébrés (méduses en particulier), mais ces données ne sont pas encore confirmées par des études biochimiques appropriées. Une protéine analogue

quant à sa fonction, mais pas quant à sa composition, la résiline a été isolée à partir de ligaments d'ailes d'insectes par ANDERSON et WEIS-FOGH (16). Cette protéine, très intéressante aussi quant à sa composition et sa fonction, joue aussi un rôle de "caoutchouc" dans l'organisme de ces insectes. En effet, la fonction principale dévolue à l'élastine est de jouer le rôle d'une protéine fibreuse élastique, c'est-à-dire des filaments doués d'une élasticité du type caoutchouteux dans plusieurs organes où la présence d'un tel facteur mécanique peut être d'importance vitale. Il en est ainsi, par exemple, des gros vaisseaux, tels que aorte, carotide, etc, du cartilage dit élastique et d'autres types de tissus conjonctifs différenciés tels que la peau, la sclère, etc.

Quand on compare la composition en acides aminés de l'élastine et du collagène, on est frappé par certaines analogies telles que la présence d'un tiers de résidus de glycine et d'environ une centaine de résidus de proline dans les deux types de molécules. A part le collagène et le C_{1q} du complément, l'élastine est la seule protéine des vertébrés à contenir de l'hydroxyproline. Ceci a suggéré à certains auteurs, au cours des années 1950, une origine commune à ces deux protéines et on a même suggéré que l'élastine dériverait de la "dénaturation" du collagène. Ces hypothèses, basées surtout sur des réactions histologiques, effectuées sur des tissus pathologiques, n'ont pas pu être vérifiées ultérieurement. Entre-temps, en effet, les notions de

"codage génétique" de la structure primaire des protéines se sont précisées et, aujourd'hui, nous n'admettons plus la "transformation" d'une protéine en une autre avec une séquence d'acides aminés différente.

La particularité principale de l'élastine est sa grande richesse en acides aminés aliphatiques, voire hydrophobes (environ 80 % des résidus d'acides aminés) ainsi que la présence d'acides aminés pontiques très spécifiques, la desmosine et l'iso-desmosine qui sont absentes dans toute autre protéine connue et examinée jusqu'à ce jour. C'est d'ailleurs sur ce point que la différence est la plus certaine entre l'élastine et la résiline, la protéine élastique des insectes, car cette dernière contient comme acide aminé de pontage des résidus de polytyrosine (16).

Ce pontage est nécessaire du point de vue rhéologique afin d'obtenir un réseau protidique dont la structure est réversiblement modifiable. Sans ces ponts covalents, la déformation impartie par une force mécanique quelconque à un réseau fibrillaire protidique ne pourrait pas être parfaitement réversible. Or, c'est la fonction essentielle d'un caoutchouc de retrouver spontanément sa conformation, sa longueur et sa forme originale après la cessation d'action de la force mécanique qui en a provoqué la modification.

A l'instar du caoutchouc, l'élastine "vieillit" aussi et ce

vieillissement a été l'un des objets de nos études. Vieillissement signifie perte de structure et de fonction et on connaît le rôle important que jouent les modifications de l'élastine dans le vieillissement et dans les altérations pathologiques de la paroi artérielle. Ce vieillissement est en partie l'oeuvre d'enzymes, telles que les élastases, potentialisée par les interactions avec des lipides et le calcium.

La découverte par BANGA et BALO de l'élastase pancréatique a considérablement stimulé les études sur le tissu élastique (17) (18). Ces auteurs ont réussi l'isolement et la cristallisation de cette enzyme pancréatique au début des années 50. Il s'agit là d'une enzyme protéolytique sécrétée par le pancréas avec la trypsine et la chymotrypsine et ayant une structure analogue à ces protéases. La structure de l'élastase pancréatique a été en grande partie élucidée grâce aux travaux de SHOTTON, de WATSON et de HARTLEY à Cambridge (19, 20, 21). Grâce à ces études, nous possédons non seulement la structure tridimensionnelle à une résolution de 3,5 Å de l'élastine mais aussi la séquence complète de ses acides aminés.

Les études cinétiques que nous avons entreprises nous-mêmes dès les années 50 pouvaient être ainsi reprises récemment avec une base d'interprétation structurale plus solide. D'autres élastases que celles du pancréas ont été isolées à partir de leucocytes, macrophages, de plaquettes et d'organes comme l'aorte

et la rate (22). Des découvertes récentes ont étendu considérablement le spectre des enzymes capables d'attaquer cette protéine particulièrement résistante à toutes les actions chimiques et physiques.

Nos propres études, commencées au début des années 50 sous l'impulsion de la découverte de BANGA et BALO, ont été continuées dans le laboratoire de DISCHE à l'Université Columbia en 1960-1961. Nous avons trouvé, en collaboration avec DISCHE, que l'alcool éthylique potentialise d'une façon considérable la dépolymérisation alcaline de l'élastine. En milieu aqueux, celle-ci est très résistante à l'action hydrolytique de la soude. En présence d'éthanol ou de certains autres solvants organiques, l'élastine est rapidement "solubilisée" par la potasse. Ces études ont conduit à la "théorie hydrophobe" de la structure de l'élastine qui est aujourd'hui généralement acceptée.

Au cours de ce travail, nous allons discuter successivement :

- 1°/ les propriétés physicochimiques de l'élastine par rapport à sa structure et sa composition,
- 2°/ le mécanisme d'action des élastases,
- 3°/ le rôle des glycoprotéines de structure dans la biosynthèse de l'élastine et, finalement

4°/ des modifications pathologiques de l'élastine au cours de l'artériosclérose et du vieillissement.

o o o

Afin de distinguer les références bibliographiques des références faites à nos propres travaux publiés au cours des 20 dernières années des parenthèses renvoient à la bibliographie générale et des crochets aux références à nos propres travaux dont certains sont ajoutés en annexe à cette rédaction.

Les expériences exposées dans cette thèse ont été effectuées au cours des vingt dernières années en collaboration avec un certain nombre de collègues et d'élèves que j'aimerais citer et remercier ici pour la contribution importante qu'ils ont bien voulu apporter à ces travaux.

En premier, j'aimerais mentionner ma femme Barbara ROBERT, décédée le 27 Mai 1974 et avec qui nous avons collaboré pendant près de vingt ans sur ce sujet. Un volume *in memoriam* de la série de monographies "Frontiers of Matrix Biology" lui a été consacré en hommage à ses qualités et accomplissements scientifiques.

Les premiers travaux sur l'élastine et l'élastase ont bénéficié de la collaboration de mon ami le Prof. P. SAMUEL, Professeur à l'Université Rockefeller, spécialiste de renommée internationale du métabolisme du cholestérol.

La plupart des travaux récents ont été effectués en collaboration avec Mme KORNFELD-POULLAIN et Mr William HORNEBECK aidé de Mr J.C. DEROUETTE, tous trois ayant soutenu des thèses sur ce sujet {66, 67, 68}.

L'élastase plaquettaire a été isolée et caractérisée en collaboration avec Mr Yves LEGRAND de l'équipe de mon ami le Prof. J. CAEN, qui a soutenu récemment sa thèse d'Etat sur ce sujet {69}.

Les études sur les interactions entre élastine et lipides ont été effectuées en collaboration avec le Prof. B. JACOTOT de l'Unité de Recherche sur l'Artériosclérose que dirige le Professeur J.L. BEAUMONT.

Les Patrons et Maîtres suivants ont eu la générosité de m'accueillir et de rendre possible l'exécution des travaux faisant l'objet de ce mémoire. Je tiens à exprimer ici toute ma gratitude et mon fidèle attachement à la mémoire de mon premier Patron en France, le Prof. M. POLONOVSKI (de 1949 à sa mort) ; le Prof. Max F. JAYLE à qui je dois mon orientation actuelle (1954-1959) ; le Prof. R.J. WINZLER (Chicago, 1959-1960) ; le Prof. Z. DISCHE (New-York, 1960-1961) et le Prof. B. HALPERN (1962-1966). Depuis 1967 je partage avec mon frère, A.M. ROBERT,

la responsabilité du Laboratoire de Biochimie du Tissu Conjonctif dont plusieurs membres m'ont grandement aidé dans l'exécution des travaux relatés. Que leur zèle et leur compétence soient remerciés ici : Mme M. MOCZAR, Mlle D. BRECHEMIER, Mme S. JUNQUA, Mr G. GODEAU, Mr J.C. DEROUETTE.

La frappe, la présentation de cette thèse, ainsi que celle de la plupart des notes publiées sur ce sujet doivent beaucoup au zèle et au dévouement de Mme A.M. FISCHER qui assure le secrétariat de notre laboratoire depuis plus de dix ans. J'aimerais exprimer ici ma sincère admiration et gratitude pour ses qualités humaines et professionnelles.

° ° °

Passer sa thèse de Sciences à 52 ans n'est certainement pas chose commune ni chose facile à cause des nombreuses charges et obligations qui encombrent la vie d'un chercheur à cette phase de sa carrière. Si j'ai pu rattraper ce retard, dû à la guerre et à l'expatriement, c'est surtout grâce à la compréhension de mes amis et collègues de l'Université de Lille, le Professeur J. MONTREUIL et le Professeur G. BISERTE, tous deux élèves du Prof. M. BOULANGER pour qui je garde une admiration sincère.

Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma sincère reconnaissance, amitié et attachement.

Le Prof. G. SPIK m'a fait l'honneur d'accepter de faire partie de mon jury de thèse, qu'elle accepte l'expression de ma sincère gratitude et de ma profonde sympathie.

Le Professeur Miles PARTRIDGE, FRS, ami de longue date a bien voulu se joindre à ses collègues français pour faire partie de ce jury et prononcer aussi, cet après-midi, la 3ème Conférence *in memoriam* Barbara Robert. Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère admiration pour son oeuvre et de ma profonde reconnaissance pour l'honneur qu'il me fait ainsi qu'au Club Français du Tissu Conjonctif en acceptant cette invitation.

Le Professeur A. DELAUNAY, Président de ce Club, m'a fait le grand honneur d'accepter la présidence de ce jury auquel je me suis permis de soumettre mes résultats accumulés au cours de ces 20 dernières années. J'aimerais exprimer ici toute mon admiration pour l'homme, le poète, l'écrivain, l'animateur de colloques et le scientifique qu'est A. DELAUNAY. Qu'il trouve ici l'assurance de ma très profonde sympathie.

II - MATERIEL ET METHODES

ABRÉVIATIONS INHABITUELLES UTILISÉES :

- TCA : acide trichloracétique
- LLB : ligament large de boeuf
- GPS : glycoprotéines de structure
- MMI : macromolécules de la matrice
intercellulaire
- MF : microfibrille

II - MATERIEL ET METHODES

L'élastine, utilisée dans nos expériences, a été préparée soit à partir d'aorte de porc ou d'aorte humaine, soit à partir de ligaments larges de bovidés. Les méthodes couramment employées au cours de ces études sont données dans le Tableau I. Deux de ces méthodes sont en partie originales :

- 1°/ le traitement à l'acide trichloracétique à 70 %, et
- 2°/ l'autoclavage dans la guanidine en tant que méthode d'extraction sélective et complète des glycoprotéines de structure associées.

La plupart de ces méthodes ont été décrites dans une revue analytique récente {60}.

La méthode la plus simple est celle de Lansing (23) consistant à extraire avec la soude 0,1 N à 100° pendant 45 minutes toutes les autres protéines en laissant dans le résidu insoluble

l'élastine. Cette méthode, bien que dégradante, est commode et rapide.

Une troisième méthode originale, mais destinée non pas à la purification de l'élastine, mais à l'établissement quantitatif de son rapport aux autres protéines tissulaires, est celle qui consiste à extraire les tissus avec les solvants suivants : CaCl_2 1 M-tris 0,05 M-acide citrique 0,02 M, (tampon CTC); TCA 2,7 % à 90°, 30 minutes, urée 8 M-mercaptoéthanol 0,1 M, potasse 1 M éthanol aqueux 80 % v/v, méthode dont le schéma est donné sur la Figure 1 et qui a été couramment employée avec une autre variante utilisant la collagénase à la place de l'acide trichloracétique. Ces méthodes ont été utilisées avec profit pour la détermination quantitative des composants macromoléculaires de la paroi artérielle {10}.

Les échantillons d'élastine le plus souvent utilisés au cours de nos expériences ont été préparés soit par la méthode de LANSING à la soude, modifiée par BALO et BANGA (17) et nous-mêmes {11}, soit par la méthode de KEELY et PARTRIDGE (24), soit encore par notre méthode au TCA dont l'avantage est de fournir une élastine pratiquement incolore et riche en glycoprotéines de structure (microfibrilles). Nous avons en effet vu, au cours de nos travaux antérieurs sur ces glycoprotéines, qu'elles résistent au traitement à l'acide trichloracétique {16}. Les détails de ces méthodes sont

Figure 1

Schéma du fractionnement des macromolécules de l'aorte et de la purification de l'élastine {10, 16}. Extraction des macromolécules diffusibles avec le CaCl_2 1 M, du collagène polymérique avec le TCA à chaud, des glycoprotéines et protéoglycannes avec l'urée 8 M-mercaptoéthanol 0,1 M.

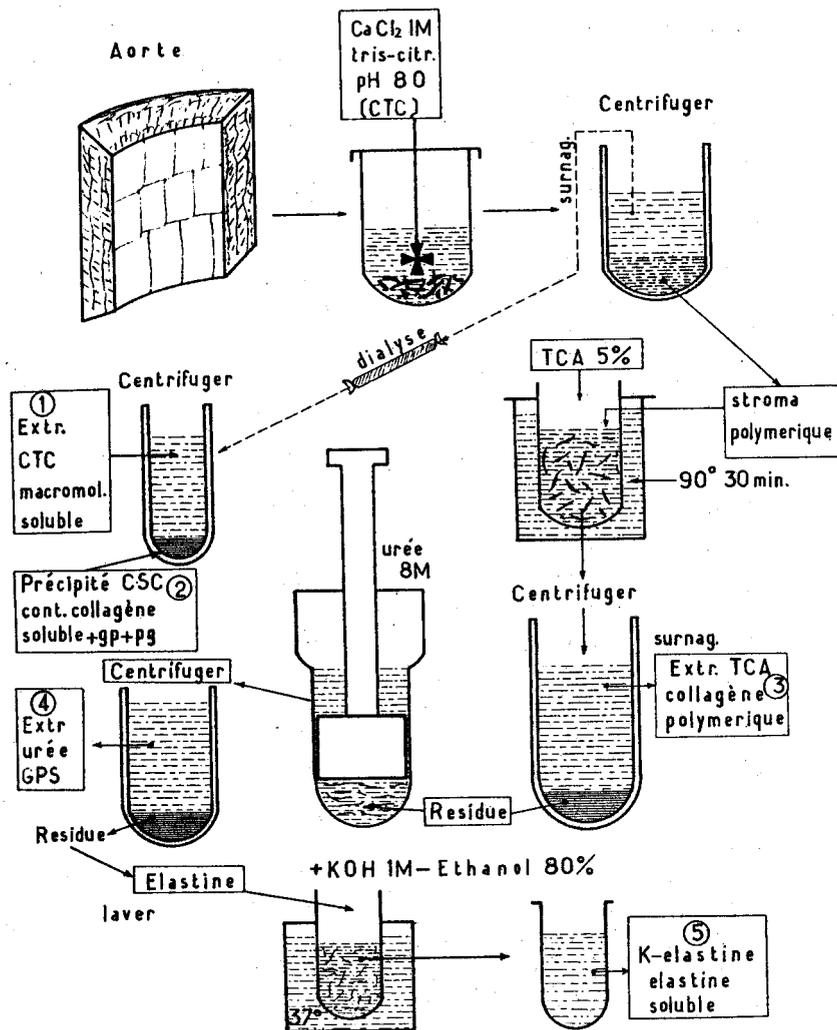


Figure 2

Purification de l'élastine polymérique avec le TCA à 70 %
{60}.

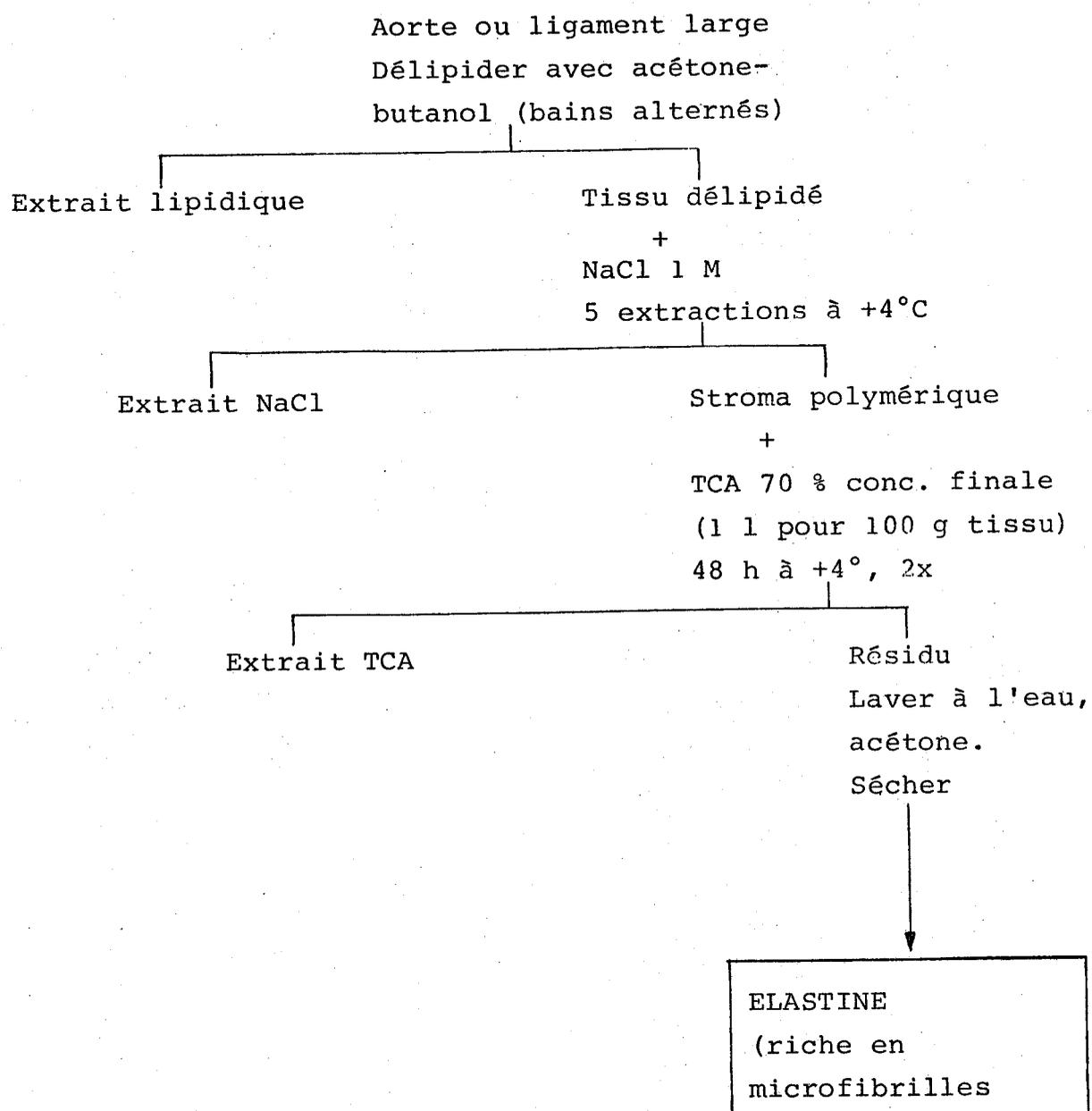
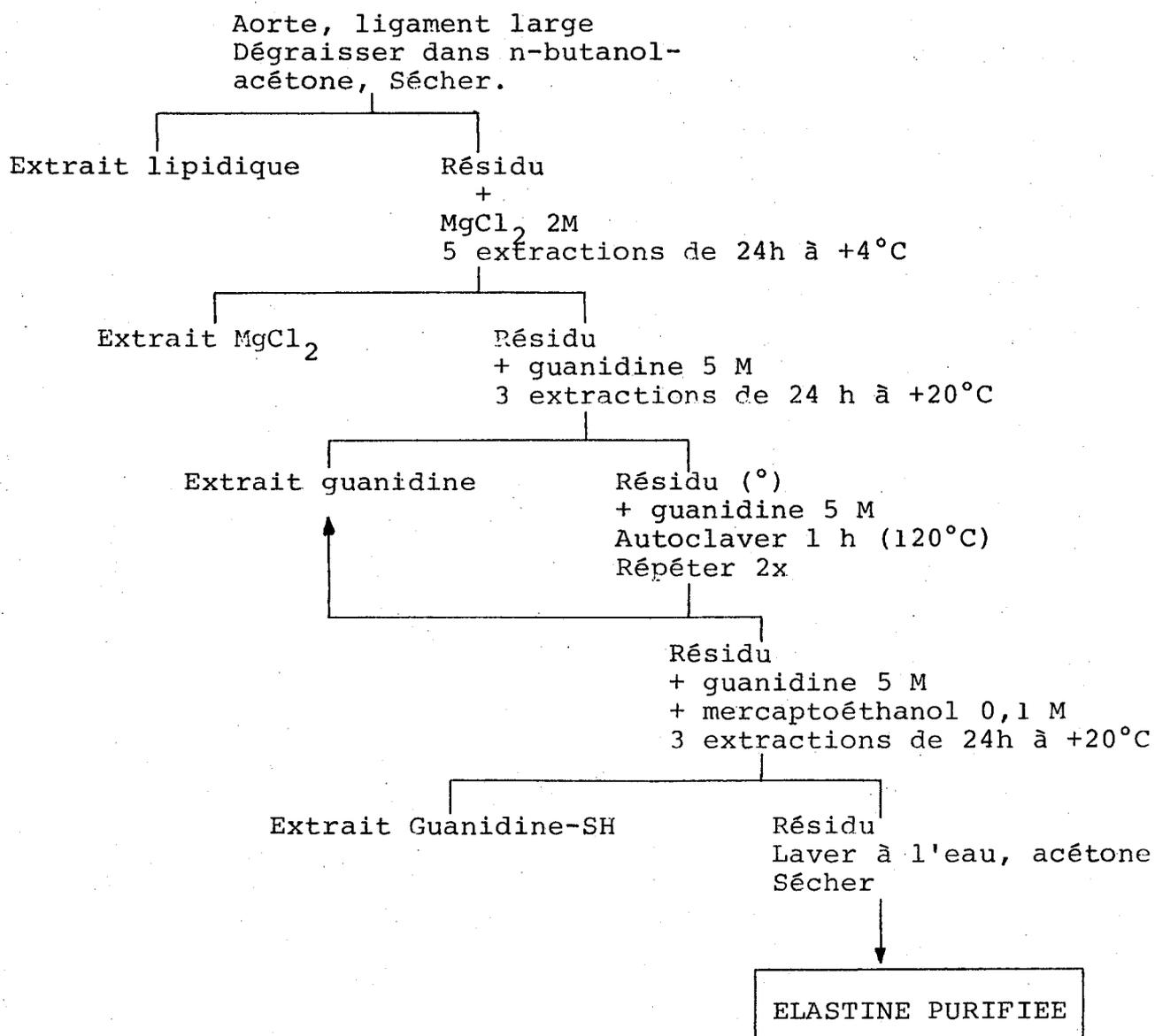


Figure 3

Purification de l'élastine par autoclavage dans la guanidine [80].



(°) Cette étape peut être remplacée par une digestion à la collagénase.

donnés sur les diagrammes de préparation (voir Figures 1, 2 et 3).

Préparation des glycoprotéines de structure (microfibrilles)
à partir de l'aorte et du tissu élastique

Ces préparations ont été décrites dans les références {10, 16, 17, 28, 36} et le schéma représenté sur la Figure 4 donne les détails de cette méthode. Nos préparations de glycoprotéines de structure proviennent :

- a) soit directement de l'aorte (voir Figures 1, 3 et 4)
- b) soit à partir d'élastine purifiée préalablement par l'une des méthodes précédemment décrites comme, par exemple, celle de LANSING à la soude, soit par l'acide trichloracétique à 70 %, ou encore par d'autres méthodes représentées sur le Tableau I.

Ensuite, ces préparations d'élastine sont soumises à une série d'extractions à l'urée 8 M 2-mercaptoéthanol 0,1 M d'une façon répétée à +4°C. Les extraits urée-mercaptoéthanol sont dialysés et lyophilisés. Ces extraits sont ensuite soit fractionnés par gelfiltration, soit analysés directement, soit encore étudiés par microscopie électronique {39}.

D'autres extraits aortiques utilisés au cours de nos études immunologiques et pathologiques ont été obtenus soit par la

méthode CTC, TCA, urée (voir Figure 1), soit par la méthode à l'extraction au chlorure de magnésium-guanidine (voir Figure 3).

Antisérums antiélastine ou anti-extrait aorte

Les antisérums sont préparés par injection à des lapins albinos ou Fauves de Bourgogne de quantités de 5 mg de protéines (élastine purifiée ou κ -élastine), ou encore d'autres extraits d'aorte (extrait CTC ou glycoprotéines de structure purifiées) en présence d'adjuvant complet de Freund, 2 fois par semaine par la voie intradermique et intramusculaire. Après 2 mois d'immunisation on intercale une semaine de repos suivie d'un rappel intrapéritonéal sans adjuvant et 5 jours plus tard on saigne les lapins par cannulation de l'artère carotide.

Le titre des antisérums est déterminé par hémagglutination passive utilisant soit des globules rouges de lapin fraîchement prélevés et fixation de l'antigène par la benzidine, soit des globules rouges glutaraldéhydés et fixant les antigènes, soit par la benzidine, soit par chromage, soit à l'aide d'un carbodiimide hydrosoluble ou encore par adsorption (25).

Préparation de κ -élastine

Ces peptides solubles d'élastine sont obtenus par hydrolyse ménagée de l'élastine insoluble en présence de potasse 1 M et

éthanol aqueux à 80 % (v/v) ou en utilisant d'autres mélanges aqueux-organiques {11}. La solution ainsi obtenue est neutralisée à l'acide perchlorique ; le perchlorate de potassium est éliminé par centrifugation et le surnageant est concentré dans un évaporateur rotatif. Si on désire éliminer les peptides de faible poids moléculaire, présents dans l'hydrolysate, on dialyse et on lyophilise. La teneur en protéines est déterminée par la méthode au biuret {3}.

Préparation des élastases

L'élastase pancréatique utilisée dans ces travaux est obtenue soit de Whatman Biochemicals (Angleterre), soit de Sigma Chem. Co (USA), soit encore du Dr. BIETH de Strasbourg (préparée par la méthode de SCHOTTON (26)).

L'élastase plaquettaire et l'élastase aortique sont préparées comme décrit dans les références {26, 30, 35, 43, 55}.

L'activité des élastases est déterminée par plusieurs méthodes, soit en utilisant l'élastine fibreuse marquée à l'iode {14}, soit les substrats synthétiques comme Tri-Alanine méthyl-ester au titrigraphe {30}, soit encore les substrats chromogènes tels que le paranitrophényl-tri-alanine-méthyl-ester, soit le succinyl-p. nitrophenyl-méthyl-ester de la trialanine (du Dr. BIETH de Strasbourg (27)) ou encore par la méthode de lyse en gel de

κ -élastine-agarose {43}. L'hydrolyse des substrats chromogènes est enregistrée au spectrophotomètre Beckman Acta III pendant environ 5 minutes et la pente, à la partie initiale de la courbe d'hydrolyse, est considérée comme la mesure de la vitesse initiale de la réaction enzymatique. Ces vitesses sont exprimées soit en mg d'élastine hydrolysée par minute par mg de protéines, soit, le plus souvent, en équivalent d'élastase pancréatique cristallisée, c'est-à-dire en μ g d'élastase pancréatique de porc donnant la même activité que l'enzyme étudiée rapportée à 1 mg de protéine enzymatique dans la solution à déterminer.

Méthodes de dosages chimiques

La teneur en protéines des solutions est déterminée soit selon LOWRY (28), soit selon une méthode du micro-biuret (29).

Les oses sont dosés selon la méthodologie décrite par MONTREUIL et SPIK (30). La teneur en hexoses est dosée à l'orcinol; la teneur en hexosamines par la méthode de NELSON-MORGAN modifiée par BLIX ; la teneur en acides uroniques selon DISCHE ; la teneur en acide sialique selon WARREN modifiée par AMINOFF.

La teneur en hydroxyproline est dosée après hydrolyse à 1'HCl 6 N à 110° pendant 6 heures, selon BERGMAN et LOXLEY (31).

Les groupements aminés N-terminaux sont déterminés selon la méthode de SANDBERG comme décrite par FRANKEL-CONRAD *et al.* (32) ou en utilisant le chlorure de dansyl (33). Les résultats obtenus sont corrigés pour la perte au cours de l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique (34).

Etudes en culture d'organe et en culture cellulaire

La biosynthèse de l'élastine est étudiée soit en incubant des fragments d'aorte, fraîchement prélevés et découpés à partir de lapins normaux ou traités dans un milieu Krebs-Ringer phosphate pendant 4 heures en présence d'un précurseur radioactif approprié tel que lysine-¹⁴C ou proline-¹⁴C et glucosamine-³H (en double marquage), suivi de lavage et d'extractions fractionnées des macromolécules selon une des méthodes représentées sur les schémas des Figures 1 à 3.

Des études analogues ont été effectuées en culture d'organe. Les aortes de lapins nouveaux-nés ou jeunes (environ 100 à 400 g) ou adultes ou vieillissants (de 2 à 4 kg) sont prélevées, découpées en petits morceaux et mises en culture dans des boîtes de Falcon-Petri en présence de milieu Eagle MEM et de sérum foetal de veau 10 % avec les mêmes précurseurs radiomarqués. Après 3 ou 6 jours de culture, les aortes sont prélevées, lavées et soumises au fractionnement comme ci-dessus, suivi des dosages et des déterminations de la radioactivité par scintillation liquide dans un appareil Intertechnique en présence du liquide de Bray.

Les lapins utilisés proviennent de l'élevage consanguin (souche "Alfort") du Prof. THERET de l'Ecole Vétérinaire de Maison-Alfort.

Les cultures cellulaires sont obtenues en trypsinisant les explants, après environ 1 semaine de culture, et en les cultivant dans des boîtes de Roux en présence du même milieu MEM-Eagle. Quand la confluence est obtenue, on trypsinise et on réensemence les cellules et on utilise la 4ème sous-culture ainsi obtenue pour les études de biosynthèse. Pour ces études, on incube 10^{10} cellules dans le milieu Eagle MEM en présence de sérum de veau 10 % et en présence du traceur radioactif comme décrit pour les incubations de courte durée {62}.

Ces études permettent de déterminer la radioactivité spécifique des fractions macromoléculaires obtenues comme représenté sur les Figures 1 à 3 et comme décrit dans les tableaux donnant les résultats.

Détermination des acides aminés pontiques de l'élastine :

lysino-norleucine, desmosine, iso-desmosine

Ces dosages sont faits par notre méthode d'électrophorèse sous haut voltage {34}. L'hydrolyse HCl 6 N de 72 heures de l'élastine, suivie d'évaporation, reprise de l'hydrolysat plusieurs fois avec de l'eau, suivie d'évaporation dans le dessiccateur, finalement reprise de l'hydrolysat dans une petite quantité d'eau, suivie

de dépôt sur papier Whatman 3M et électrophorèse haut voltage pendant 3 heures à 5000 V dans un tampon pyridine-acétate à pH 3,5, suivie de révélation à la ninhydrine, découpage et dosage de la coloration par colorimétrie après élution.

Pour les dosages de radioactivité d'acides aminés pontiques radioactifs, on utilise la même technique et une bande témoin est colorée, éventuellement éluee et dosée, tandis que les bandes non colorées sont découpées, éluees et comptées au scintillateur liquide.

Détermination de la radioactivité

Toutes les déterminations sont effectuées par scintillation liquide au compteur Intertechnique N° SL 30 avec correction pour le "quenching" par témoin interne et pour les rapports de canaux. Les résultats sont donnés en dpm/mg de protéines, soit en dpm/ μ M de substances marquées.

III - RESULTS

III - RESULTATS

Les principaux résultats obtenus au cours des vingt années d'études sur l'élastine et les élastases seront exposés brièvement dans 4 chapitres : le 1er (A) décrit l'étude des interactions hydrophobes de l'élastine par une méthode simple et originale (étude de la dispersion alcaline de l'élastine en milieu aqueux-organique) et la théorie hydrophobe de l'élasticité de l'élastine. Le 2ème (B) chapitre concerne l'interaction entre élastine et élastase, surtout les aspects de cinétique hétérogène de la réaction. Le 3ème (C) chapitre décrit certaines expériences sur les composants glycoprotidiques du tissu élastique que sont les glycoprotéines de structure et leur rapport avec les microfibrilles. Enfin, dans le 4ème (D) chapitre nous relaterons les aspects immunologiques de l'élastine, l'induction d'une artériosclérose par immunisation avec l'élastine et l'effet de la calcitonine sur ce phénomène ainsi que le vieillissement de l'élastine et sa biosynthèse en fonction de l'âge.

Les références entre crochets renvoient aux publications originales dont les plus importantes sont jointes à cette rédaction en fin de texte. La bibliographie, encore qu'assez complète, n'est pas exhaustive à cause du grand nombre de publications qui ont vu le jour au cours de ces dernières années. Deux monographies récentes complètent les revues déjà citées (12,14), la première est celle éditée par SANDBERG et FRANZBLAU en deux volumes à la suite du 1er Colloque International entièrement consacré à l'élastine et l'élastase (août 1976, Alta, Utah, USA (35)). La 2ème est le Volume 7 de "Frontiers of Matrix Biology" édité par L. ROBERT chez Karger. Ce volume, actuellement sous presse, écrit par J. BIETH et L. ROBERT est entièrement consacré à l'élastine et l'élastase. Ces ouvrages donnent une bibliographie assez complète des travaux consacrés à l'élastine et à l'élastase.

o o o

A- PROPRIETES PHYSICOCHEMIQUES DE L'ELASTINE

ROLE DES INTERACTIONS HYDROPHOBES

1°/ Introduction : hydrolyse acide et alcaline de l'élastine ; rôle des forces hydrophobes

L'élastine est la protéine la plus résistante de l'organisme car, parmi les méthodes de purification, on trouve par exemple des traitements aussi drastiques que l'ébullition dans la soude 0,1 N à 100° pendant 45 minutes ou le chauffage dans l'acide formique à 80 % à 45°C ou encore l'autoclavage répété (voir Tableau I). Bien que sa composition en acides aminés soit assez similaire à celle du collagène (richesse en glycine, proline, présence d'hydroxyproline, etc.) l'élastine est beaucoup plus résistante à l'hydrolyse acide ou alcaline que le collagène.

La Figure 5 montre l'inverse du temps de dispersion (hydrolyse avec solubilisation) de 10 % de l'élastine mise en oeuvre (100 mg) en fonction de la concentration de l'acide (HCl) ou de la base (KOH) à 37°C (dans un volume final de 10 ml). Jusqu'à 0,3 M environ, ce paramètre de vitesse de réaction ($1/t$ 10 %) augmente linéairement avec la concentration de l'agent hydrolysant. A partir de cette concentration, la sensibilité à l'acide diminue par rapport à celle à l'alcali. La relation

TABLEAU I

Principales méthodes employées pour la purification de l'élastine {60}. L'organe (aorte, ligament large) est dégraissée, extraite avec un tampon aqueux à force ionique élevée. Le stroma insoluble est ensuite hydrolysé par divers moyens physiques ou chimiques.

N°	Méthode	Références
1	Chauffage dans le NaOH 0,1 N pendant 45 minutes	LANSING <i>et al</i> (23) BANGA (17, 18)
2	Autoclavage répété dans l'eau	PARTRIDGE (8-11)
3	Chauffage dans l'acide formique à 88 %	AYER <i>et al</i> (12)
4	Autoclavage dans l'acide acétique à 1 %	HALL (103){60}
5	Incubation avec la trypsine et la collagénase	HOSPELHORN et FITZPATRICK (104)
6	Extraction par la guanidine à 5 M + dithiothréitol, suivie de collagénase.	ROSS et BORNSTEIN (67)
7	Extraction avec le TCA à 70 % à +4°C	ROBERT <i>et al</i> {28}
8	Extractions successives avec CaCl ₂ 1 M, TCA 2,9 % à 90°, urée 8 M-mercaptoéthanol 0,1 M.	ROBERT <i>et al</i> {10, 16}
9	Extractions successives avec MgCl ₂ 2 M, guanidine, avec autoclavage et guanidine-mercaptoéthanol.	ROBERT <i>et al</i> {80}



Figure 5

Vitesse de dispersion (hydrolyse avec solubilisation) de l'élastine par l'HCl et le KOH en milieu aqueux.

Abscisses : concentration de l'agent hydrolytique

Ordonnées : inverse du temps (min) nécessaire pour "solubiliser" 10 % de l'élastine.

ELASTINE

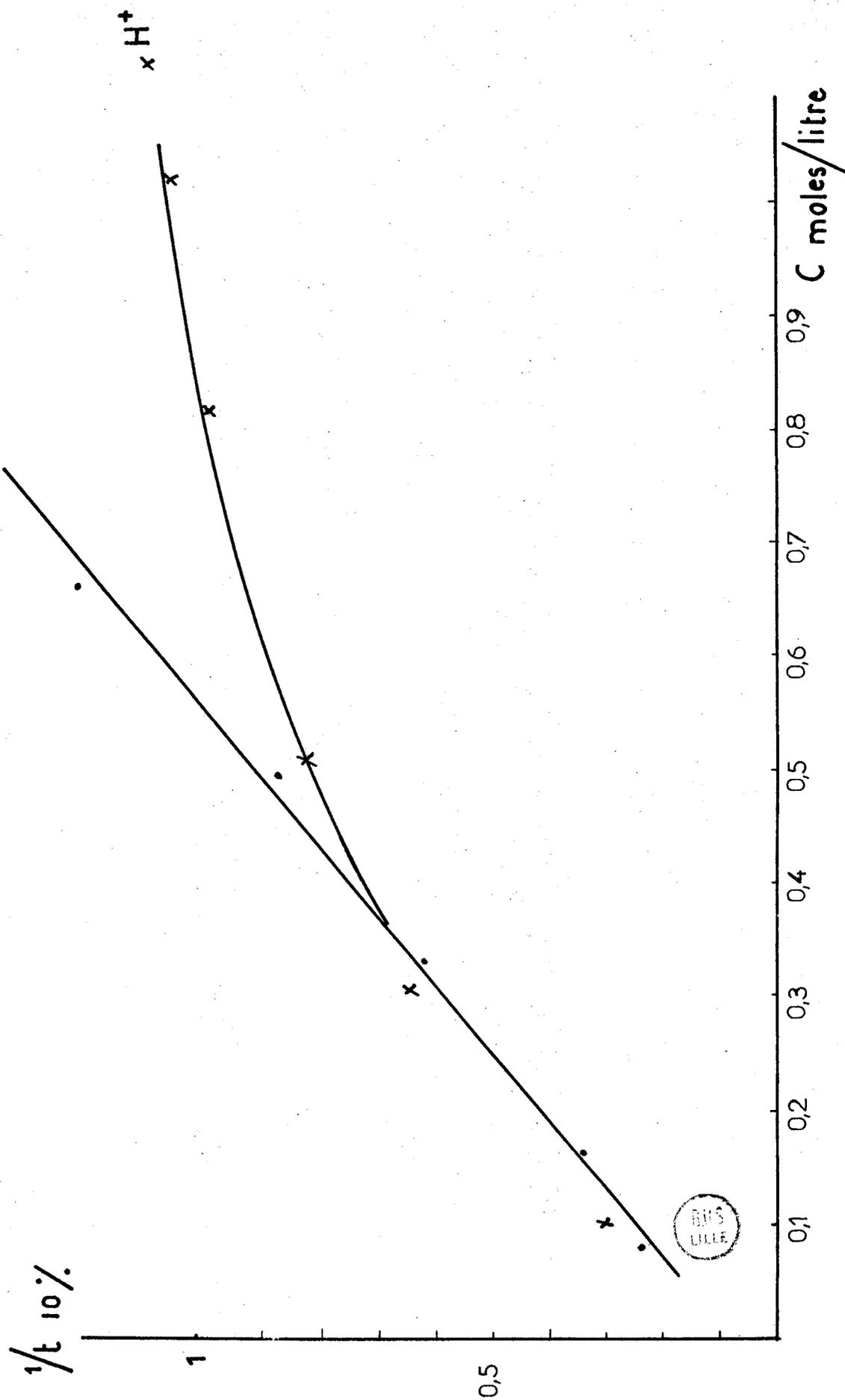


Figure 6

Vitesse de dispersion acide (I) et alcaline (II) du collagène polymérique.

Abscisses : concentration de l'agent hydrolytique

Ordonnées : inverse du temps (min) nécessaire pour 10 % de dispersion {67}.

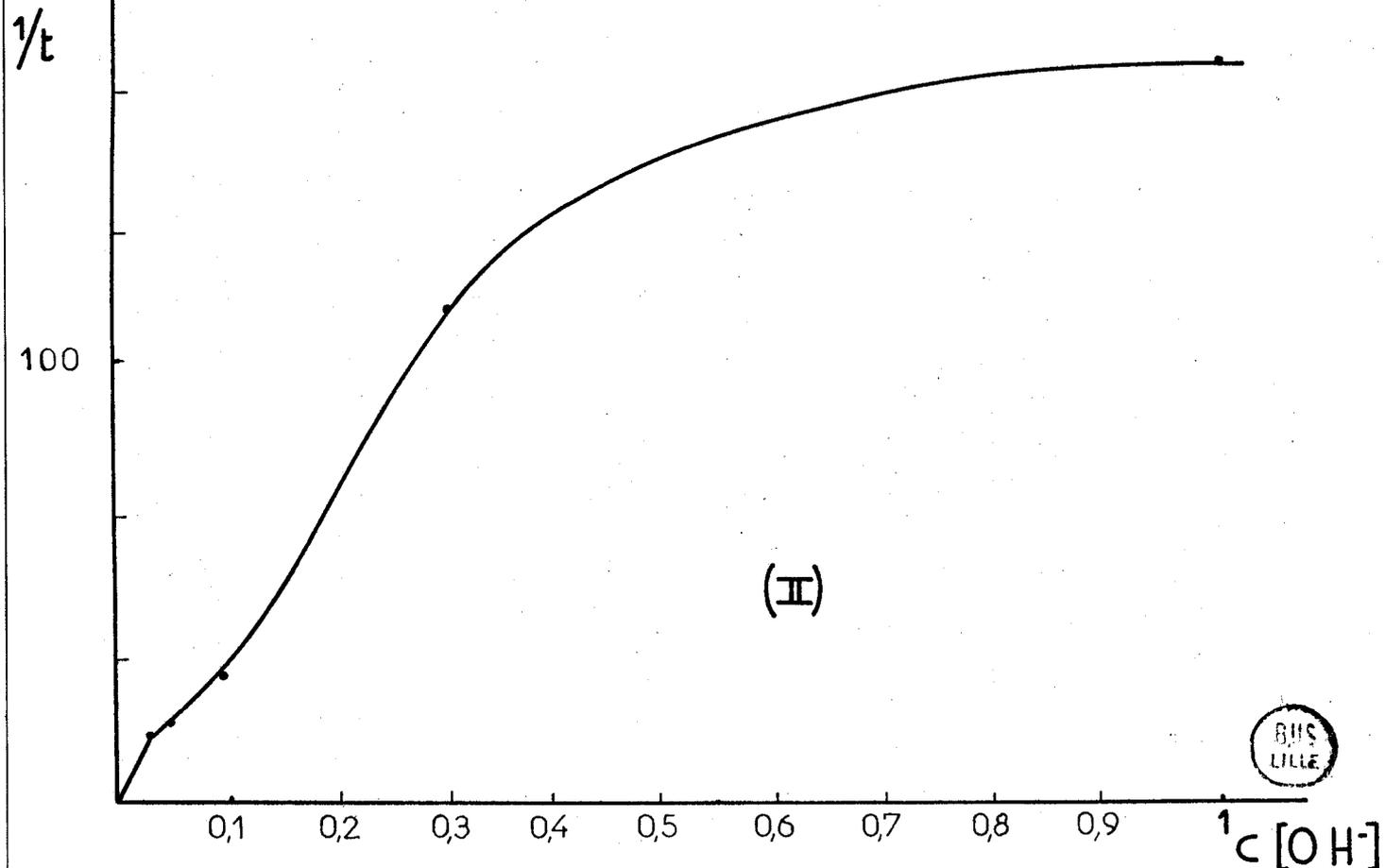
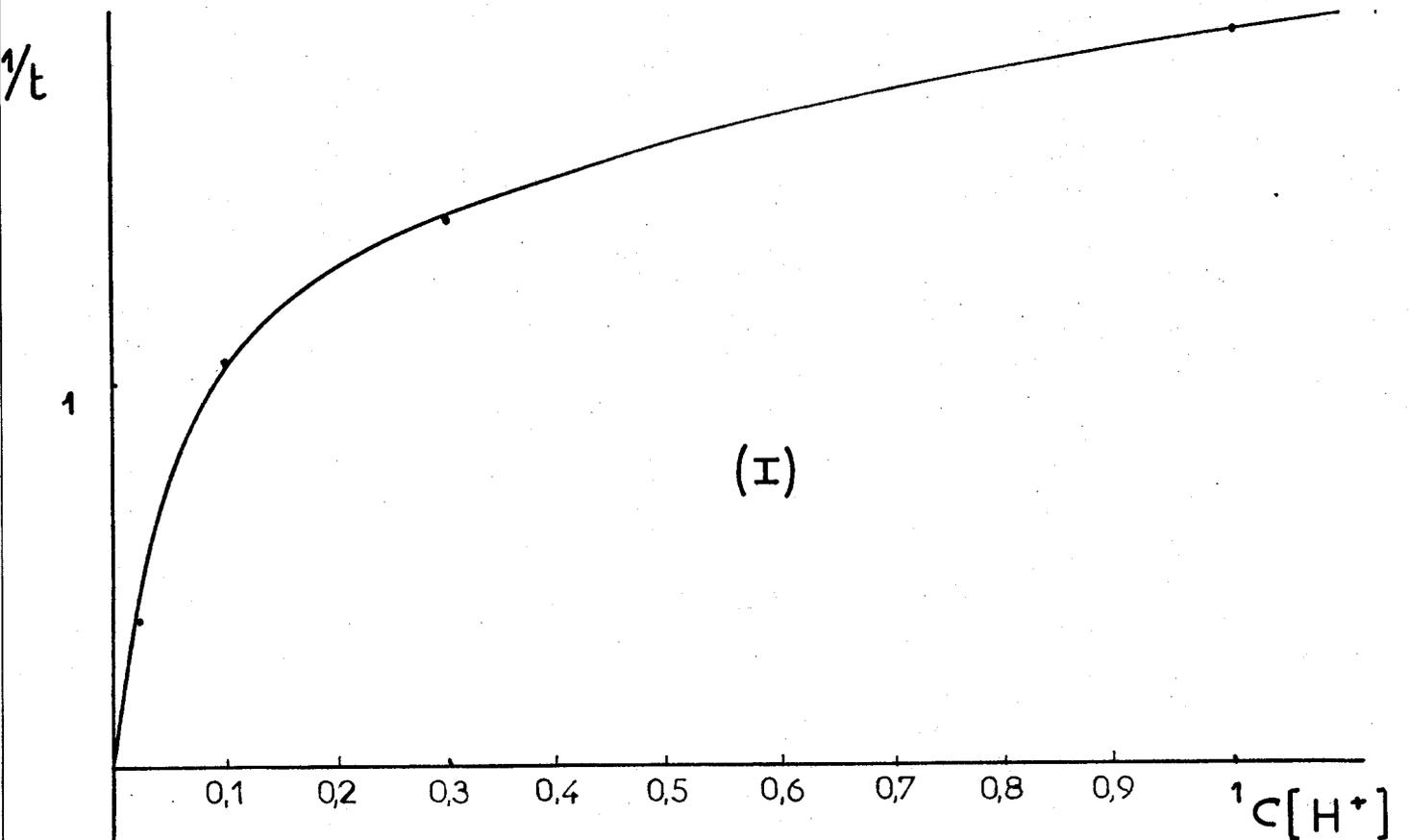


Fig. 8

COLLAGENE

entre $1/t$ 10 % (qui est une bonne mesure de la vitesse initiale de la réaction) et la concentration en OH^- reste linéaire jusqu'à environ 1 M.

Pour le collagène, il existe une grande différence entre la sensibilité à l'hydrolyse acide ou alcaline. La Figure 6 montre ce même paramètre de vitesse $1/t$ 10 % en fonction de la concentration en HCl ou en KOH. A 0,1 M la vitesse initiale de la dispersion alcaline du collagène polymérique par le KOH est environ 30 fois supérieure à la vitesse de dispersion acide.

L'élastine se révèle environ 5 fois plus résistante à l'hydrolyse acide que le collagène et environ 60 fois plus résistante que celui-ci à l'hydrolyse alcaline. Cette différence (calculée ici pour 0,1 M HCl ou KOH et 10 % de dispersion) dépend de la nature de l'anion de l'acide et du cation de la base. Ainsi, la différence de sensibilité est beaucoup plus grande à l'hydrolyse par l'acide trichloracétique (TCA) qui peut être utilisé pour l'hydrolyse sélective du collagène sans pratiquement toucher à l'élastine (voir Figure 1).

L'élastine résiste aussi à la plupart des protéases (sauf les élastases) et cette grande résistance chimique et physique pose des problèmes d'ordre physicochimique et structural. Rien dans la composition de l'élastine ne permet d'expliquer cette très forte résistance par des forces physiques telles qu'interaction

coulombienne, interaction hydrogène, étant donné la monotonie de composition en acides aminés de l'élastine. Dans cette composition (voir Tableau II) entrent, pour environ 80 %, des acides aminés aliphatiques ou hydrophobes. Il est apparu, au cours de nos études sur la structure de l'élastine, que la seule explication plausible de cette très grande résistance résidait dans la présence d'interactions hydrophobes relativement importantes {3, 6, 7, 8, 11}. Nous avons admis que ces interactions hydrophobes assurent la stabilité thermodynamique de la structure tridimensionnelle de l'élastine, diminuant au maximum le contact entre les acides aminés aliphatiques hydrophobes et l'eau. L'eau joue un rôle très important dans la structure de l'élastine car sa présence est nécessaire pour son élasticité. L'élastine, entièrement desséchée, perd son élasticité. Il apparaît donc que l'eau est nécessaire pour les propriétés rhéologiques essentielles de l'élastine. Néanmoins, l'eau doit être exclue du voisinage immédiat des résidus aliphatiques de l'élastine qui doivent être étroitement empaquetés, grâce à la structure secondaire et tertiaire de l'élastine, d'une façon telle que le contact entre les résidus aliphatiques hydrophobes soit maximalisé et que les contacts entre ces résidus et l'eau soient minimaux.

Des régions, relativement peu étendues, comportant les résidus d'acides aminés polaires, tels qu'acides aminés dicarboxyliques, basiques et pontiques (desmosine), sont probablement accessibles aux solvants mais leur importance est faible.

TABLEAU II

Composition en acides aminés des élastines solubles (tropoélastine) et des élastines matures, polymériques, en résidus pour 850 résidus(°). D'après SANDBERG (14).



	Aorte de porc		Aorte de poulet		LLB	
	Soluble	Polymérique	Soluble	Polymérique	Soluble	Polymérique
Gly	275	278	287	294	272	280
Ala	196	197	149	150	189	191
Pro	95	98	122	105	79	99
HyPro	8	9	8	21	7	11
Val	110	101	122	145	126	117
i-Leu	15	15	14	17	17	21
Leu	38	45	41	50	47	51
Tyr	12	13	9	12	5	5
Phe	24	28	14	18	28	24
Arg	4	5	4	4	4	4
Lys	38	5	37	3	42	3
Desmosine (en Lys)	0	12	0	8	0	8
Asp	3	5	7	3	5	5
Thr	12	12	8	6	7	8
Ser	8	9	13	4	8	8
Glu	16	16	15	11	13	14
Met + Cys + Trp + His	0	1	0	0	0	0

(°) On admet une longueur de chaîne de 850 acides aminés.

2°/ Mise en évidence d'interactions hydrophobes dans l'élastine par l'étude de l'hydrolyse alcaline en milieu aqueux-organique

Une première confirmation de cette théorie hydrophobe, que nous avons proposée en 1962, a été l'étude physicochimique menée en collaboration avec d'abord Mme KORNFELD-POULLAIN {66} puis avec Mr W. HORNEBECK {67} sur l'effet de solvants organiques sur la structure de l'élastine. Ces études ont montré que la très grande résistance à l'hydrolyse alcaline de l'élastine est considérablement diminuée en présence de solvants organiques tel que l'éthanol par exemple {3, 11}.

Le protocole de ces expériences est le suivant : 100 mg d'élastine fibreuse préparée par la méthode de LANSING sont mis en suspension dans 10 ml d'un mélange ternaire comportant le solvant organique à étudier (X ml) en présence de 20 % du volume final (2 ml) de potasse aqueuse, donnant une concentration finale en KOH de 1 M. Le volume total est ramené à 10 ml avec du méthanol (10 -(X + 2) ml) dont l'"efficacité" a été trouvée nulle. On peut voir sur la Figure 7 que la vitesse d'hydrolyse alcaline est considérablement accélérée en présence de concentrations croissantes d'alcanols, comme par exemple l'éthanol.

Avec le rallongement de la chaîne aliphatique, la vitesse d'hydrolyse alcaline augmente. Ou, autrement exprimé, plus la chaîne aliphatique du n-alcanol est longue, moins il en faut pour obtenir la même vitesse de dispersion de l'élastine. C'est-

Figure 7

Dispersion alcaline de l'élastine en présence d'alcools aliphatiques normaux à concentration variable.

Abscisses : fraction molaire de l'alcool dans le mélange ternaire (alcool + méthanol) 80 % + KOH aqueux 20 % (v/v)
KOH concentration finale 1 M.

Ordonnées : % d'élastine dispersée à 37°C en 5 heures.

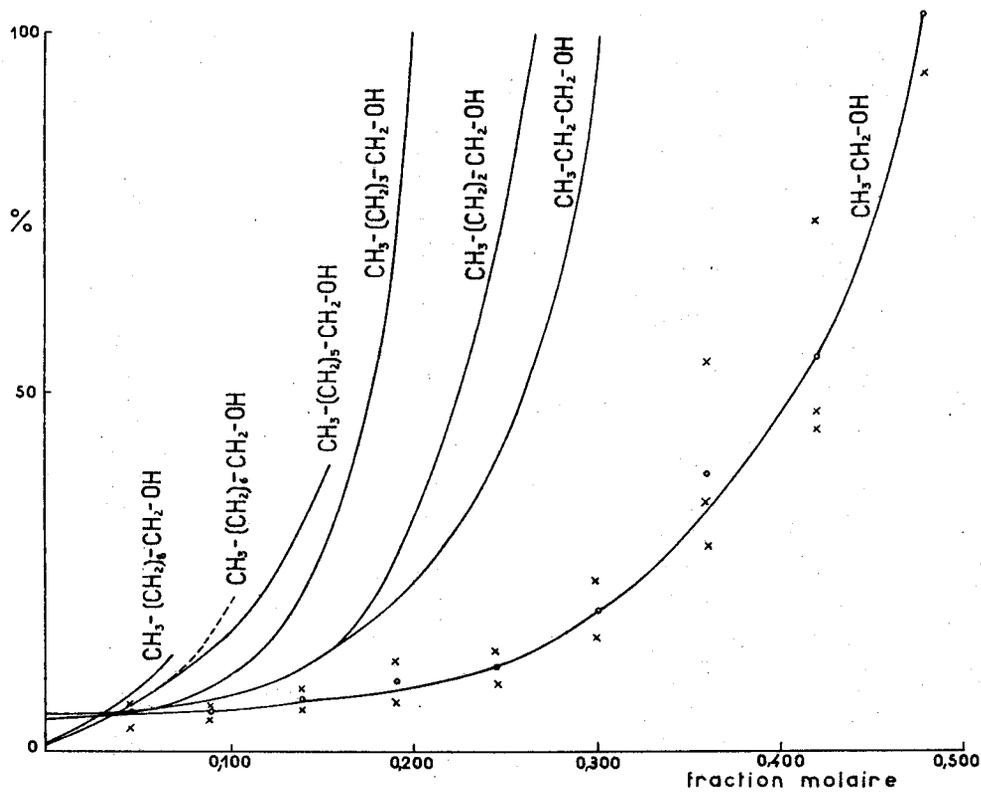


Figure 8

Efficacité des solvants organiques dans la dispersion alcaline de l'élastine (17).

Abscisses : nombre de résidus $-CH_2$

Ordonnées : efficacité définie comme $1/n_{50}$

(n_{50} = fraction molaire donnant 50 % de dispersion de l'élastine dans des conditions déterminées).

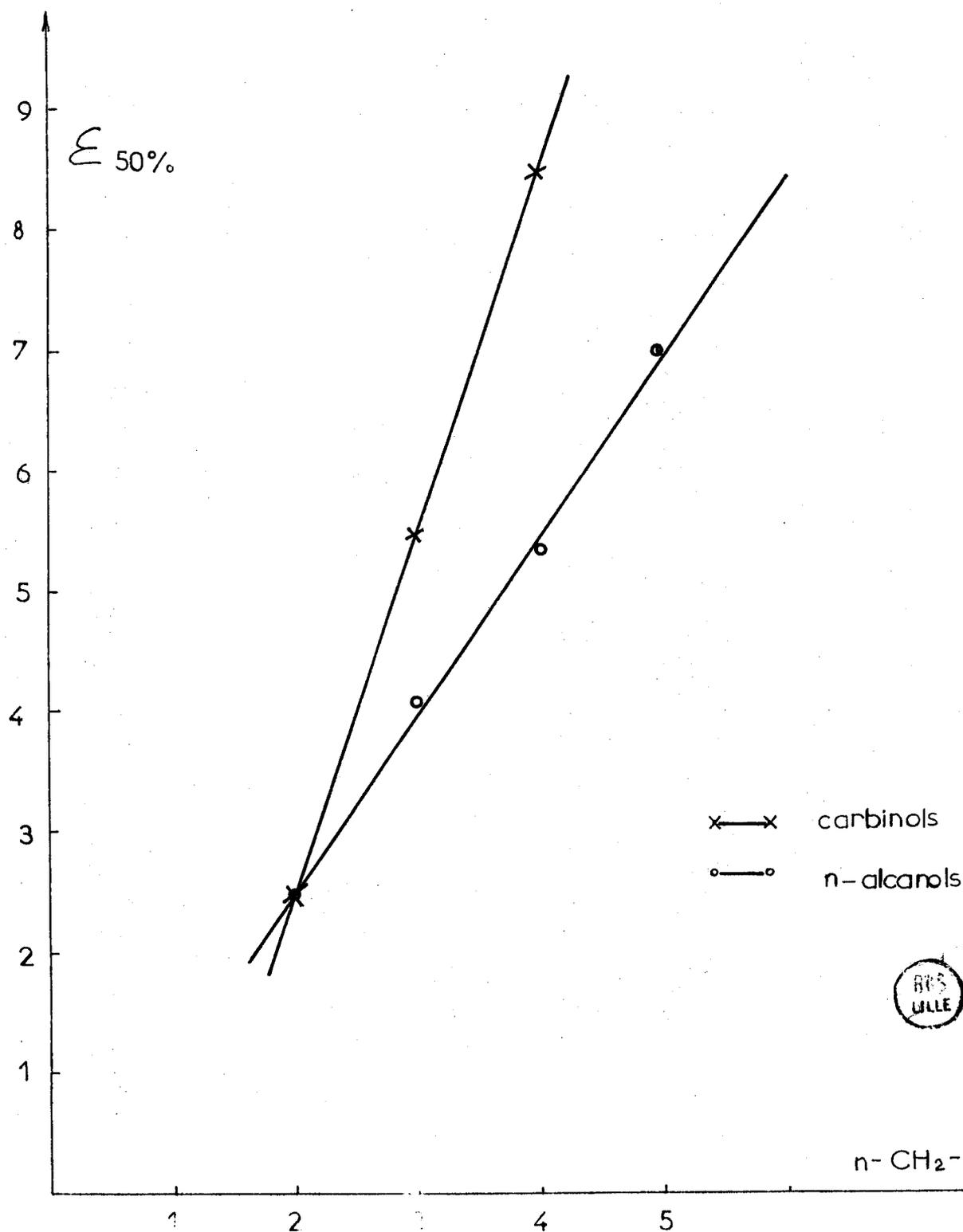


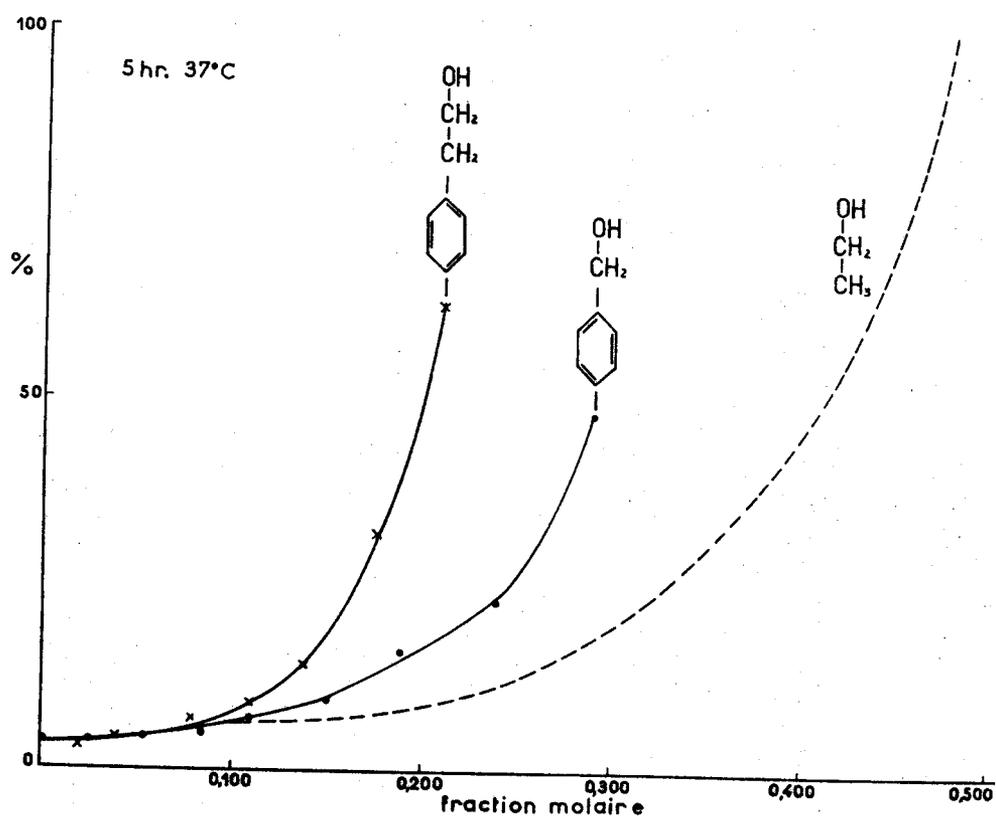
Figure 9

Dispersion alcaline de l'élastine en milieu aqueux-organique
(alcool éthylique, benzylique, phényléthylique).

Abscisses : fraction molaire de l'alcool dans le mélange ternaire
(alcool + méthanol) 80 %, KOH aqueux 20 % (v/v).

KOH concentration finale 1 M.

Ordonnées : % d'élastine dispersée à 37°C en 5 heures.



à-dire que l'efficacité des solvants organiques dépend de la longueur de leur chaîne aliphatique. L'efficacité ϵ d'un solvant organique peut être définie comme la fraction molaire du solvant (dans le mélange ternaire ci-dessus défini) donnant 10 %, 50 % ou 100 % de dispersion dans un temps donné (1 heure par exemple) à 37°C : ϵ_{10} , ϵ_{50} ou ϵ_{100} ainsi mesurées sont directement proportionnelles au nombre de résidus $-\text{CH}_2-$ dans la chaîne aliphatique {11}. La pente de cette droite (voir Figure 8) est nettement plus élevée pour la série de carbinols : méthanol, éthanol, i-propanol tertiaire, butanol que pour les alcools aliphatiques à chaîne non ramifiée. Ceci suggère une certaine importance pour la configuration de la chaîne aliphatique pour son efficacité. Une telle corrélation est suggérée aussi par la comparaison de l'efficacité des alcools aromatiques, l'alcool benzylique et phényléthylique (Figure 9). La présence du noyau benzénique augmente beaucoup l'efficacité, comme le montre la comparaison des courbes de dispersion de ces deux alcools aromatiques avec celle de l'éthanol.

Cette potentialisation de l'effet hydrolytique des ions OH^- par les solvants organiques s'exerce à toutes les concentrations de l'espèce hydrolytique. La Figure 10 montre cependant que l'efficacité du solvant organique (en l'occurrence le tert.-butanol) augmente avec la concentration des ions OH^- et plafonne à une concentration apparemment saturante du solvant. L'augmen-

tation de la vitesse d'hydrolyse alcaline par le tert.-butanol est beaucoup plus grande à 0,6 M de KOH qu'à 0,1 M de KOH (voir Figure 10). Cette coopérativité entre les ions OH^- et le solvant organique suggère un effet "dénaturant" pour le mécanisme de l'activation de l'hydrolyse alcaline. Le solvant organique en milieu alcalin paraît accélérer une transconformation de la chaîne peptidique, probablement par rupture et désorganisation des interactions hydrophobes. Conformément à cette hypothèse, le log. de la constante de vitesse de la dispersion alcaline ($\log k$) augmente linéairement avec la concentration en tert.-butanol (exprimé en fraction molaire) (voir Figure 11).

Un autre argument en faveur de la nature hydrophobe de la réaction de dispersion alcaline est le phénomène de compensation entropie-enthalpie que nous avons pu vérifier avec W. HORNEBECK {33, 67}. Nous avons montré que la dispersion alcaline, comme d'ailleurs l'hydrolyse enzymatique de l'élastine, suit la loi d'Arrhenius {33} : le log de la vitesse de la réaction décroît linéairement avec l'inverse de la température absolue. En appliquant donc la théorie de vitesse absolue des réactions selon EYRING (36) on a pu calculer les paramètres thermodynamiques de la réaction pour différents solvants organiques utilisés à différentes concentrations. Comme le montre la Figure 12, il existe en effet une relation linéaire entre l'entropie d'activation ΔS^\ddagger de la réaction et son enthalpie d'activation ΔH^\ddagger comme l'ont suggéré SUNG (37) et LUMRY et

Figure 10

Dispersion alcaline de l'élastine en fonction de la concentration du KOH, en présence de 20 % (v/v), 40 % et 50 % de tert.-butanol, à 37°C.

Abscisses : concentration du KOH en Moles/l

Ordonnées : % d'élastine dispersée.

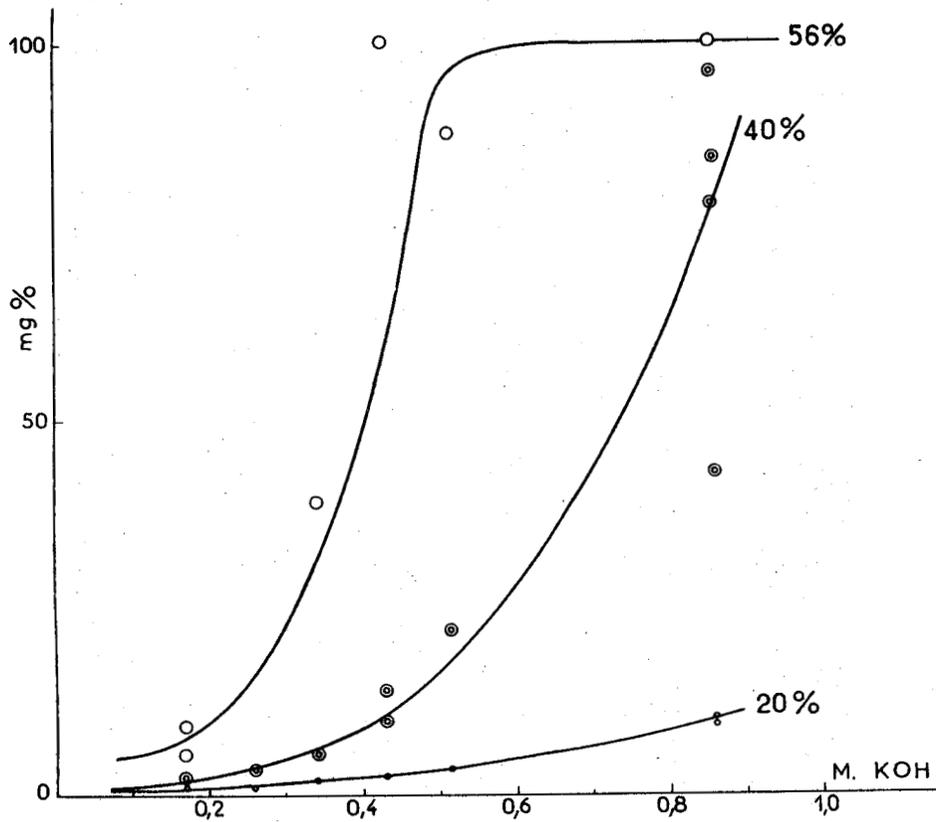


Figure 11

Vitesse initiale (k) et $\log k$ de la dispersion alcaline de l'élastine en fonction de la concentration du tert.-butanol.

Abscisses : fraction molaire du tert.-butanol, en présence de KOH 1 M, 37°C.

Ordonnées : vitesse, k ou $\log k$.

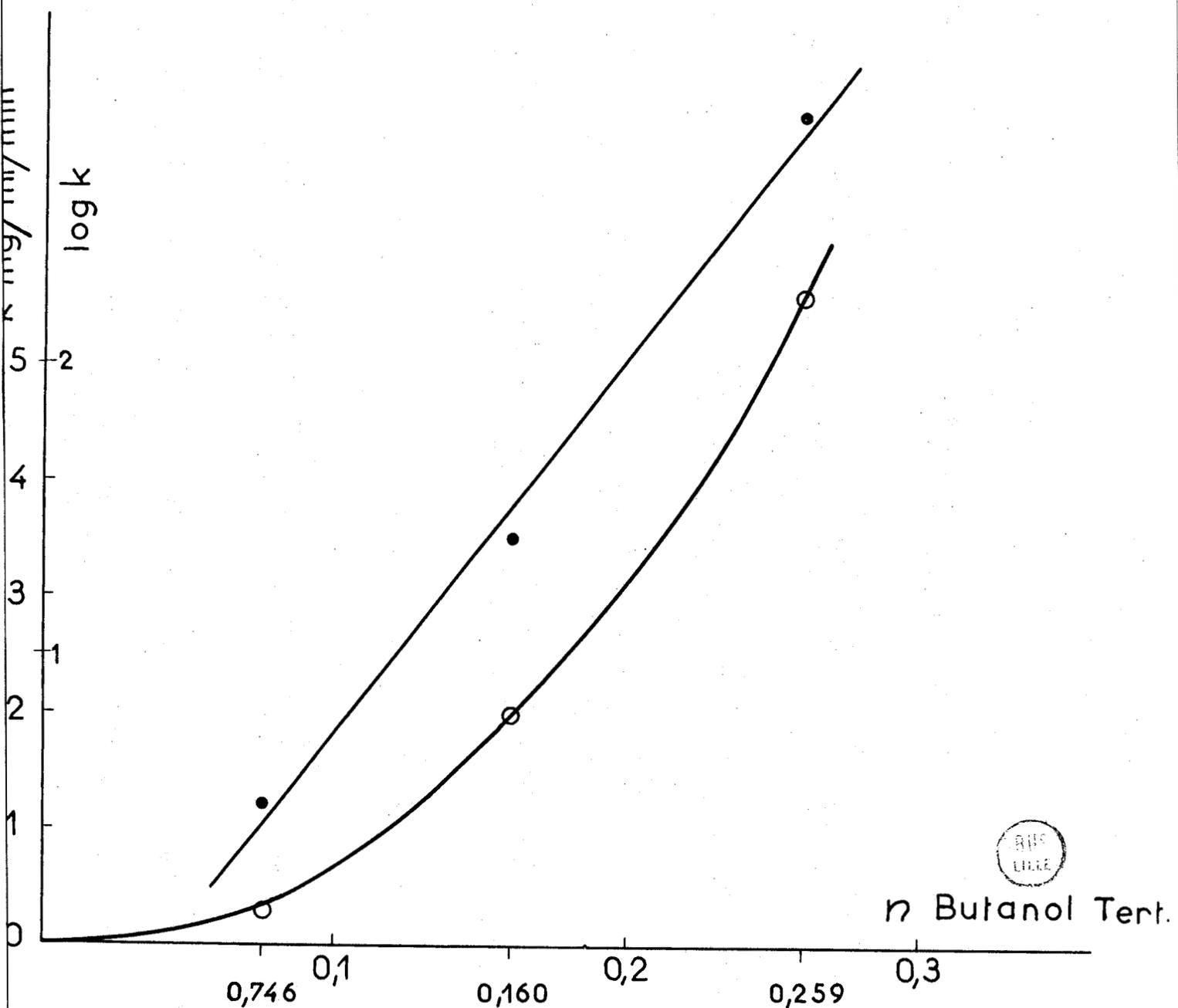


Figure 12

Compensation entropie-enthalpie au cours de la dispersion alcaline de l'élastine en milieu aqueux-organique {33}.

Abscisses : entropie d'activation

Ordonnées : enthalpie d'activation

ΔH^\ddagger

20000

15000

10000^{28d.}

E L A S T I N b.l.n.

• TERT. BUTANOL 20%

• ISOPROPANOL 20%

• ETHANOL 20%

• METHANOL 80%

• EAU

• ETHANOL 80%

10

20

30

40

50

ΔS^\ddagger



RAJENDAR (38) pour les réactions où l'eau participe dans le mécanisme des transformations moléculaires. C'est probablement l'explication de la nécessité de la présence d'un pôle hydrophile (-OH, -N-, -S-) sur les solvants organiques pour leur efficacité.

Le Tableau III donne la liste et les caractéristiques des solvants qui ont été trouvés "efficaces" pour accélérer la dispersion alcaline de l'élastine en présence de potasse 1 M. Le Tableau III donne le coefficient d'efficacité ϵ_{50} , c'est-à-dire la fraction molaire du solvant donnant 50 % de dispersion dans des conditions standardisées {11, 31} pour toute une série de solvants étudiés.

Nous avons pu montrer que ce n'est pas seulement l'hydrolyse alcaline, mais la "solubilisation" par des acides est aussi accélérée en présence de solvants organiques {67}.

Il semble donc que la nature aliphatique ou aromatique de ces solvants, exprimée par ce coefficient, soit le facteur déterminant leur efficacité. Quand cette qualité aliphatique est diminuée par la présence de plusieurs fonctions polaires, l'efficacité diminue. Ceci est observé aussi quand on sature le noyau benzénique: le cyclohexanol est inefficace, tandis que les alcools aromatiques sont efficaces (voir Figure 9).

L'éthylène-glycol est pratiquement inactif, tandis que l'éthanol est "efficace". Le glycérol est légèrement plus actif que

**TABEAU III « EFFICACITÉ » DES SOLVANTS ORGANIQUES
DANS L'HYDROLYSE ALCAINE DE L'ÉLASTINE EN FONCTION DE LEUR STRUCTURE.**
Pour les détails voir la note originale (35)

Dans la colonne A sont énumérés les détails de la structure de la molécule qui influencent son efficacité (ϵ).

Dans la colonne B sont énumérées les molécules étudiées.

La colonne C donne l'efficacité (ϵ_{50} pour la définition voir le texte).

La colonne D donne le rapport des atomes « apolaires » (carbone) sur les atomes « polaires » (oxygène) dans la molécule étudiée.

Dans la colonne E sont énumérées, d'une façon schématique, les régularités observées.

C_2 : charge alkyl à deux carbones, etc; f : fonction de; ↗ augmente, ↘ diminue; ϵ_{25} et ϵ_{50} : efficacité mesurée à 25 et à 50 % de dissolution de l'élastine.

A	B	C	D	E				
CHAÎNE ALKYL	SOLVANTS	$\epsilon_{50} = \frac{1}{n_{50}}$	C (**) O	OBSERVATIONS				
1. — Nombre de groupements —CH ₂ —	Alcools aliphatiques normaux	C_2 : 2,74 C_3 : 4,42 C_4 : 5,62 C_5 : 7,14	2 3 4 5	ϵ_{50} ↗ f. C_n				
	Carbinols	C_2 : 2,74 C_3 : 4,42 C_4 : 5,62	2 3 4					
	2. — Configuration de la chaîne alkyl	Alcools aliphatiques et isomères	C_4 : 4,42 iso C_4 : 5,5 C_5 : 4,65 iso C_5 : 5,61 sec C_4 : 5,61 ter C_4 : 6,33 C_6 : 5,49 iso C_6 : 5,31		3 4 5	$\epsilon_{iso} > \epsilon_{normal}$ $\frac{\epsilon_{iso}}{\epsilon_{normal}}$ ↘ f. C_n		
			3. — Comparaison S = O / — OH / C = O Hétérocycle avec 2 O, 1 O et 1 N		D.M.S.O.	3,25	2	OH et C = O > S = O C — OH ≠ C = O 2 O ≥ N + O
					Isopropanol	6,5	3	
					Acétone	5,35	2	
Cyclohexanone				6,9	5			
4. — Résidus hydrophobes — Résidus hydrophiles Introduction d'1 O	Benzène	0		Molécules hydrophobes inefficaces ϵ_{50} et ϵ_{25} f. OH supplémentaire ϵ_{25} ↘ avec — O —				
	Ether de pétrole	0						
	éthanol	2,74	2					
	Ethylène glycol	0	1					
	Propanol	$\epsilon_{25} = 9,25$ *	3					
	Propanédiol	$\epsilon_{25} = 0$	1,5					
	Glycérol	$\epsilon_{25} = 0$	1					
	Propanol	$\epsilon_{25} = 9,25$	3					
	Méthyl cellosolve	$\epsilon_{25} = 1,04$						
	Butanol	$\epsilon_{25} = 11,1$						
Ethyl cellosolve	$\epsilon_{25} = 2,3$	4						
* Les conditions expérimentales ne permettent pas d'évaluer le ϵ_{50} .								
(**) C nombre de groupes hydrophobes O nombre de groupes hydrophiles								



l'éthylène-glycol. Il semble donc que le rapport fonction polaire/fonction apolaire soit important pour la définition de l'efficacité de ces molécules.

L'étude des séries isomères de certains alcools, tels que les butanols ou des alcools amyliques et isoamyliques, a révélée une analogie frappante entre les structures les plus "efficaces" et les acides aminés aliphatiques présents en grand nombre dans l'élastine (Leu, I-Leu, Ala, Val, Phe).

On peut admettre que les interactions hydrophobes soient considérablement diminuées par "intercalage" de ces solvants organiques entre les résidus d'acides aminés hydrophobes (voir Figure 13) dissociant ainsi la structure compacte de l'élastine stabilisée par ces interactions. Cette transconformation en présence de solvants organiques serait suffisante pour rendre plus accessibles les liaisons peptidiques à l'attaque hydrolytique de l'espèce catalytique en solution, c'est-à-dire les ions OH^- ou H^+ . La Figure 13/A montre le changement (hypothétique) de l'angle α entre deux résidus d'acides aminés dans la chaîne peptidique à la suite de l'intercalage du solvant organique (éthanol). La Figure 13/B montre la dissociation de l'interaction hydrophobe entre deux résidus d'i-leucine à la suite de l'intercalage d'éthanol et l'augmentation de l'hydratation de la chaîne peptidique à la suite de cette transconformation. Les ions OH^- étant fortement hydratés, auront ainsi plus facilement accès

Figure 13

Représentation schématique de l'interaction entre solvant organique et élastine.

- a) Deux résidus d'isoleucine sont représentés en "contact hydrophobe". L'insertion de plusieurs molécules de propanol entre ces deux résidus dissocie l'interaction hydrophobe et provoque une distorsion de la configuration de la chaîne peptidique, symbolisée par l'augmentation de l'angle α en α' .

- b) Deux résidus d'isoleucine en contact hydrophobe. L'insertion de plusieurs molécules d'éthanol provoque la distorsion de la chaîne peptidique avec augmentation de l'hydratation de l'épine dorsale peptidique facilitant l'approche des ions OH^- hydratés dans le voisinage des liaisons peptidiques.

Fig. 13a

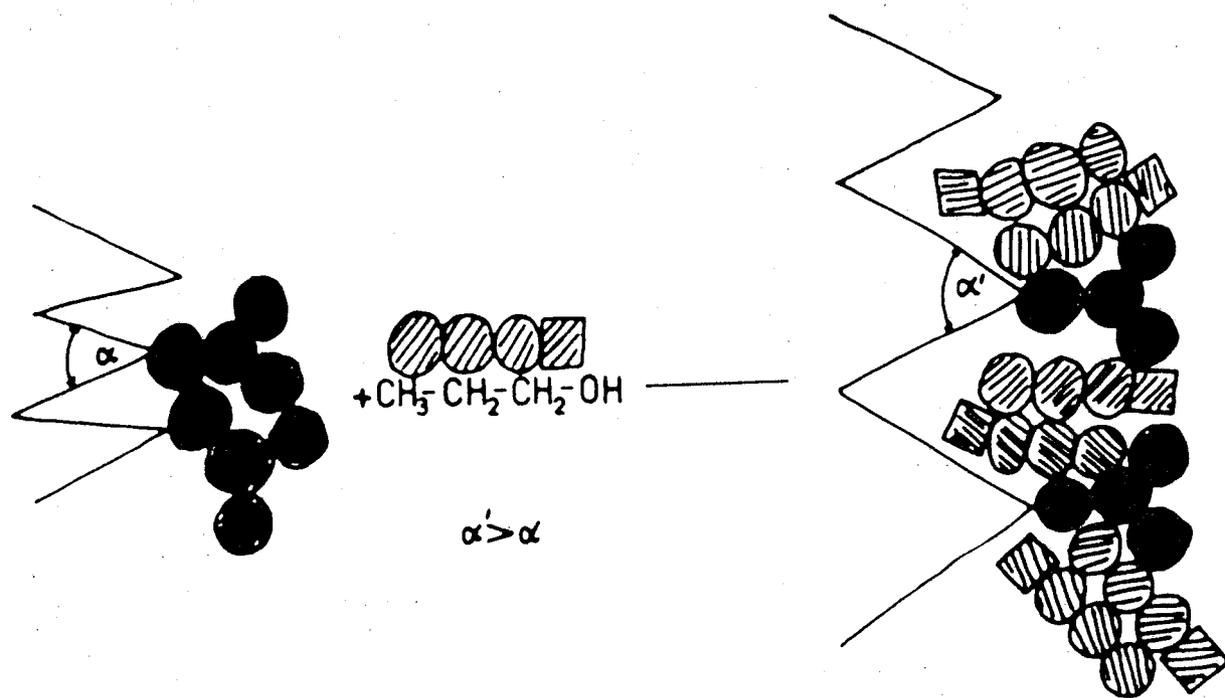
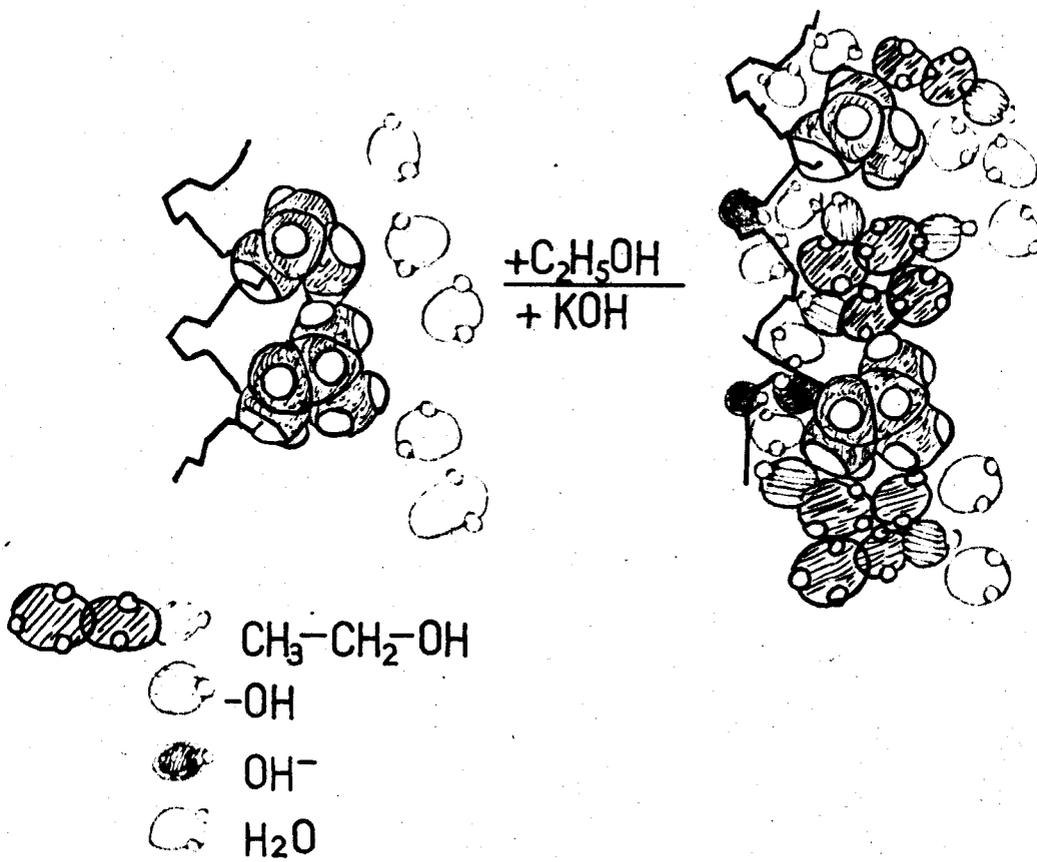


Fig. 13b



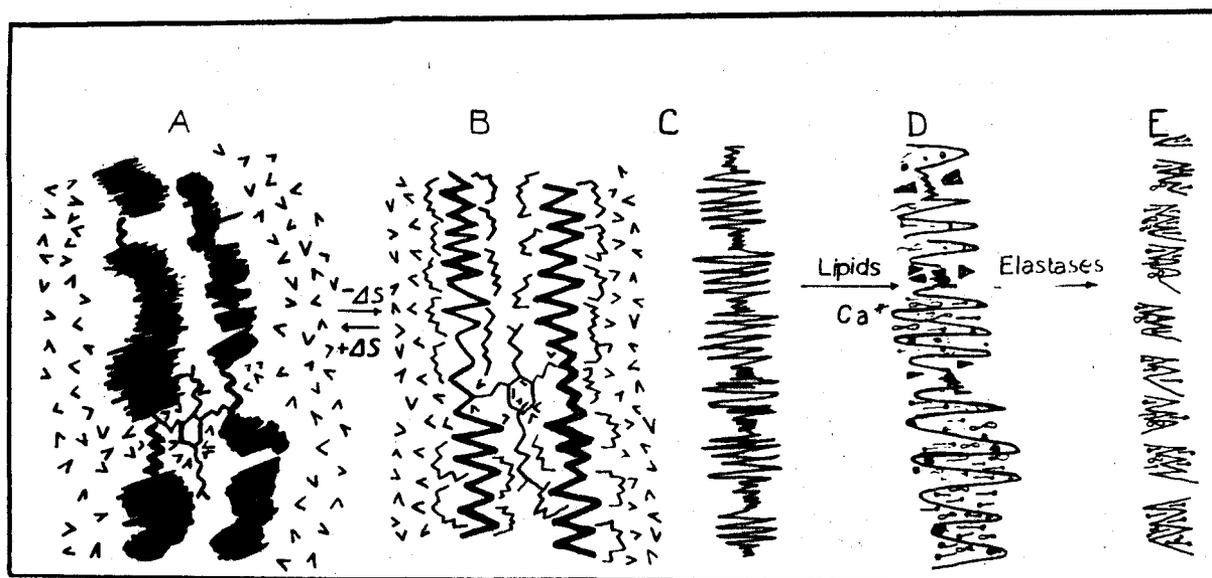
à la chaîne peptidique, d'où une accélération de l'hydrolyse alcaline. Un mécanisme analogue explique aussi la potentialisation de l'hydrolyse enzymatique de l'élastine en présence de certains lipides et détergents (39). Ces considérations ont permis de proposer un modèle pour expliquer l'élasticité de nature entropique de l'élastine. Les études de FLORY ont en effet montré que l'élasticité de l'élastine est de la même nature que celle du caoutchouc avec une prédominance du facteur entropique sur le facteur enthalpique (40).

3°/ Elasticité entropique de l'élastine

La Figure 14 montre schématiquement ce que nous avons appelé la théorie entropique de l'élasticité de l'élastine {6, 7, 11}. A l'état non étiré, ou repos, la surface des fibres est couverte de résidus d'acides aminés aliphatiques empacquetés, d'une façon serrée, dans des régions hydrophobes. L'eau est exclue du voisinage de ces régions qui protègent ainsi l'épine dorsale de la chaîne peptidique. A l'étirement, la chaîne peptidique subirait une distorsion ; les résidus aliphatiques s'éloignent les uns des autres et l'eau doit se restructurer au voisinage des chaînes aliphatiques. Ce processus doit s'accompagner d'une diminution importante de l'entropie, de 3 à 6 unités par résidu d'acide aminé aliphatique, selon les calculs de NEMETHY et SCHERAGA(41-43) Le retour à l'état initial (rétraction des

Figure 14

Représentation schématique de l'élasticité entropique de l'élastine (A - B) et de sa saturation par des lipides (C - D), suivie de perte d'élasticité et de dégradation accélérée par les élastases (E). Pour les détails voir le texte.



fibres) sera donc "spontané" car il est accompagné d'augmentation d'entropie à la suite de la reformation des régions hydrophobes et de l'exclusion de l'eau au voisinage des résidus d'acides aminés qui "réintègrent" les régions hydrophobes. L'eau ainsi "exclue" se trouve à un état plus "désorganisé", c'est-à-dire que l'entropie du système augmente.

Qualitativement, ce modèle décrit bien l'élasticité de nature entropique de l'élastine. Son analyse quantitative ne sera possible qu'après l'acceptation d'un modèle moléculaire détaillé de la fibre d'élastine. Néanmoins, les estimations de NEMETHY-SCHERAGA (43) concernant la contribution des résidus d'acides aminés aliphatiques à l'énergie libre ; l'entropie et l'enthalpie des interactions hydrophobes {31} donnent déjà une bonne base à de tels calculs. A la suite des études de séquence de SANDBERG sur la tropoélastine (44) et de URRY *et al.* sur la conformation des chaînes peptidiques de l'élastine (45), des calculs préliminaires paraissent possibles dans un proche avenir et pourront apporter de nouveaux arguments en faveur de notre modèle. Une confirmation par une méthode physicochimique, indépendante de ce modèle, a été fournie par l'étude de la chaleur d'adsorption d'alcool aliphatique par l'élastine par microcalorimétrie à flux continu {29}. La log de la chaleur de l'adsorption diminue linéairement avec la longueur de la chaîne alkyl dans la série méthanol, éthanol, n-propanol, n-butanol (voir Figure 15). Cette méthode a permis de comparer la surface spécifique de l'élastine

Figure 15

En haut : Mesure par microcalorimétrie à flux continu de l'interaction entre 0,2 % d'alcool dans l'heptane avec l'élastine (prep. acide formique) . Pour l'éthanol et le méthanol les chaleurs d'adsorption sont enregistrées ; pour les autres alcools, les chaleurs d'adsorption et de désorption sont montrées

En bas : Décroissance linéaire du log de la chaleur d'adsorption avec le nombre de résidus $-CH_2-$

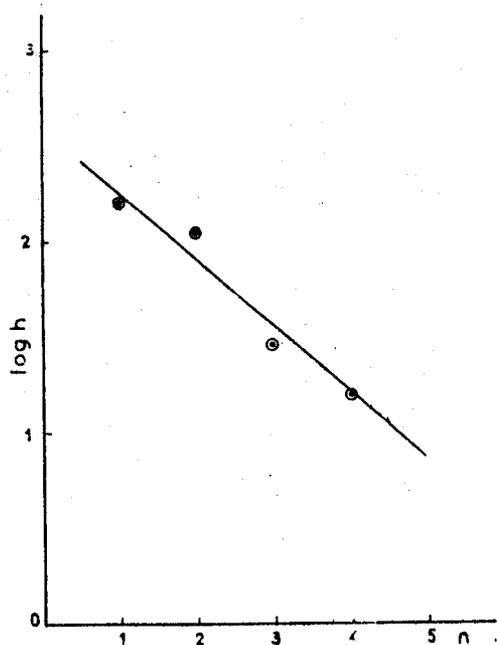
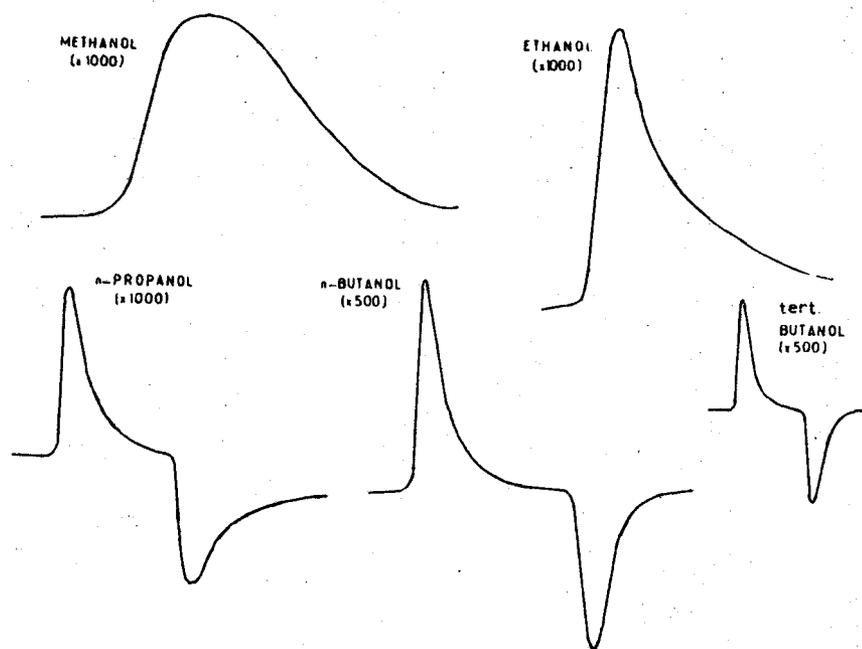


TABLEAU IV

Estimation des surfaces spécifiques des échantillons d'élastine et d'autres protéines par la méthode B.E.T. utilisant le ^{85}Kr et par microcalorimétrie à flux continu avec le n- et tert-butanol {29}.

N°	Protéine	Préparation	Surface spécifique m^2/g		
			B.E.T. ^{85}Kr	Calorimétrie (°)	
				n-Butanol	tert-butanol
1	Kératine	Barbe humaine	0,1	15 (14)	6,0 (4,4)
2	Collagène	Peau de vache	0,6	(7,0)	(1,6)
3	Elastine	Lig. nuchae bovine prep. NaOH	2,0	22 (°°°)	3,1 (°°°)
4	"	Lig. nuchae bovine prep. acide formique	4,5	28 (19)	5,6 (3,6)
5	"	Lig. nuchae bovine prep. TCA	2,2	(3,2)	(0,5)
6	Azoélastine (°°)	Lig. nuchae bovine prep. NaOH	3,0	10 (11)	1,6 (1,5)
7	Orcéine-élastine	" " " " "	1,8	1,5 (1,6)	-
8	Stroma polymérique	Lig. nuchae bovine, extr. NaCl	3,0	(6,5)	(1,0)
9	" "	Aorte humaine, extr. CaCl_2	2,8	1,2 (2,0)	0,6 (0,8)
10	Elastine	Aorte humaine, prep. NaOH	0,8	(0,7)	-
11	"	Aorte de porc, prep. NaOH	0,5	(0,2)	-
12	"	Lig. nuchae bovine, extr. guanidine	1,9	(1,2)	-
13	"	Lig. nuchae bovine, prep. autoclavée	1,0	(0,6)	-
14	"	Lig. nuchae bovine, prep. NaOH	1,0	(3,7)	-
15	κ -élastine	" " " " "	0,3	3,3 (3,2)	1,6 (1,6)
16	α, β -élastine	" " " " "	6,3	(3,1)	
17	Glycoprotéines de structure	Aorte de porc, extr. urée	2,1	(6,7)	

(°) Entre parenthèses : mesure sur échantillon gardé à l'air - sans parenthèses : échantillon séché sous vide poussé.

(°°) Pour la préparation voir {1}

(°°°) Cet échantillon a présenté, avant dessiccation, les valeurs les plus élevées : n-but : $40 \text{ m}^2/\text{g}$; tert-but. : $3 \text{ m}^2/\text{g}$

+ Avec 1 M KOH dans éthanol 80 %

‡ Avec acide oxalique 0,25 M à 100°



(préparée de différentes sources et par différentes méthodes) à celle d'autres protéines fibreuses (kératine, collagène) et de confirmer la grande surface spécifique de celle-ci. Les valeurs obtenues par cette méthode étaient en général plus fortes que celles fournies par la mesure de l'adsorption de ^{85}Kr [19]. Les surfaces estimées avec le n-butanol sont en général supérieures à celles estimées avec le tert.-butanol comme adsorbant. Il paraît probable que le n-butanol puisse s'insérer plus facilement à l'intérieur de la chaîne peptidique avec un nombre plus grand de sites de fixation que le tert.-butanol ou le Krypton (voir Tableau IV). Les alcools aliphatiques à chaîne plus courte pénètrent plus facilement à l'intérieur des fibres, d'où la chaleur d'adsorption plus importante. La forte chaleur d'adsorption mesurée avec le méthanol suggère une bonne "pénétration" de cet alcool dans l'élastine. Son inefficacité (absence d'accélération de la dispersion alcaline) est donc probablement due au fait que cet alcool ne soit pas capable de provoquer une transconformation de l'élastine.

D'autres auteurs, avec des méthodes analogues (WEIS-FOGH (46)) ou différentes (HOFFMAN, MUKHERJEE (47,48)) ont pu confirmer l'exactitude de ce modèle hydrophobe de l'élastine.

4°/ Interactions lipides-élastine

Ces mêmes principes, que nous avons dégagés au cours de l'étude de l'interaction entre élastine et solvant organique, semblent être valables pour définir l'interaction entre élastine et lipides {31, 32, 38, 48}.

Il est difficile de surestimer l'importance de cette interaction lors de l'athérogénèse et du vieillissement du tissu élastique. Ce phénomène a été étudié par des expériences *in vivo* chez le rat et par des analyses de prélèvements d'aorte *post mortem* chez l'homme {38, 48}.

a) Expériences *in vivo*

En collaboration avec le Professeur Agr. JACOTOT nous avons pu mettre au régime contenant du cholestérol- ^{14}C des rats qui, après avoir atteint leur équilibre isotopique apparent (c'est-à-dire taux constant de cholestérol- ^{14}C au niveau des lipoprotéines sériques), ont été sacrifiés et les aortes soumises à une extraction fractionnée selon le schéma de la Figure 16. Les fractions macromoléculaires ont été ensuite soumises à une extraction des lipides par le méthylal-méthanol ou par le solvant de Folch et l'activité spécifique du cholestérol a été déterminée.

Le Tableau V montre la répartition du cholestérol- ^{14}C dans les fractions macromoléculaires. On peut voir qu'une fraction non

Figure 16

Schéma de l'extraction des lipides à partir de fractions macromoléculaires de l'aorte.

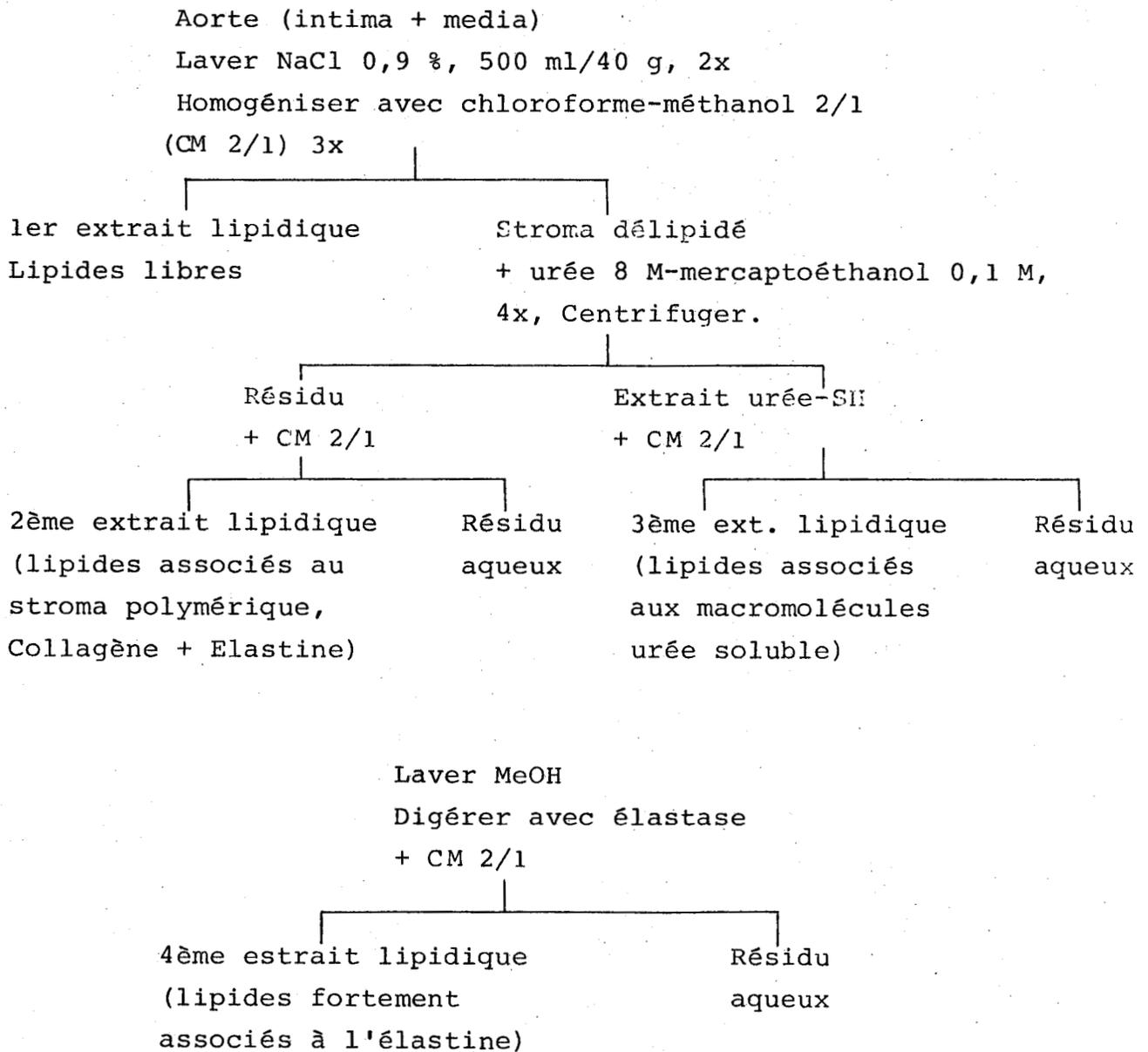


TABLEAU V

Répartition du cholestérol- ^{14}C , en % du total récupéré, dans les extraits tissulaires du rat nourri sur régime normal (N) ou sur régime contenant 4 % de cholestérol (C). Les tissus sont extraits selon une méthode analogue à celle représentée sur la Figure 1 et 16 et la radioactivité de chaque extrait est déterminée. Les analyses portent sur l'aorte et sur le tissu conjonctif qui s'est développé dans des éponges de polyvinyle implantées sous la peau.

Lipides associés avec les macromolécules des fractions extractibles avec :	Eponge		Aorte	
	N	C	N	C
CaCl_2 1M (CTC)	54,1	5,0	79,4	8,8
TCA 2,7 % à 90° (collagène)	2,5	3,0	1,8	5,0
Urée 8 M (glycoprotéines)	16,5	33,3	8,8	63,7
KOH dans éthanol (élastine)	26,9	58,7	10,0	22,5

Radioactivité spécifique des extraits, cpm/100 mg prot. régime normal			
Extrait	Peau	Eponge	Aorte
CTC	181	5944	9070
TCA	354	500	116
Urée	2950	1840	1000
KOH-éthanol	350	9700	880



négligeable du cholestérol- ^{14}C est étroitement associée à l'élastine purifiée pourtant par chauffage dans la soude. Toutes les fractions contiennent du cholestérol radioactif. La majeure partie de la radioactivité est extraite par le tampon CaCl_2 -tris-citrate chez les animaux nourris au régime normal (54 à 79 %). Par contre, chez les animaux sur régime riche en cholestérol, la majeure partie du cholestérol- ^{14}C reste associée, après extraction calcique, avec les macromolécules du stroma polymérique. 22 à 58 % du cholestérol- ^{14}C sont alors associés à l'élastine. Ce "déplacement" du cholestérol de fractions lipoprotidiques solubles vers les fractions de macromolécules fibreuses insolubles, à la suite de l'enrichissement du régime en cholestérol, peut avoir une signification physiopathologique pour expliquer la formation de dépôts lipidiques associés aux protéines fibreuses (collagène, élastine, glycoprotéines de structure). L'existence de telles associations est rendue probable par les données du Tableau V et aussi par la mise en évidence de lipides fixés dans ces fractions macromoléculaires de l'aorte humaine pathologique {48}.

Cette expérience démontre, d'une façon formelle, l'association des lipides à l'élastine *in vivo* et la solidité de ces "complexes" qui résistent aux séries de traitement chimiques.

b) Lipides associés avec l'élastine dans l'aorte humaine

Les aortes humaines normales et pathologiques correspondant

au stade d'athérome 0, 1, 2, 3, ont été groupées en deux catégories : les aortes sans lésions apparentes ou avec des lésions légères (groupe I) et des aortes avec des lésions avancées (groupe II). Dans les deux cas, seules les parties macroscopiquement saines de la paroi ont été utilisées et les parties de la paroi portant des lésions visibles ont été écartées. Ces deux groupes d'aortes sont soumis à une extraction fractionnée (voir Figure 16) et chaque extrait macromoléculaire a été encore soumis à plusieurs extractions avec le mélange de Folch afin de séparer les lipides des protéines auxquelles ils sont associés {48, 59}.

Dans chaque extrait lipidique on détermine le cholestérol libre et estérifié, les triglycérides, les acides gras libres, les phospholipides et aussi, par chromatographie en phase gazeuse, le spectre des acides gras (libres ou estérifiés) dans chaque fraction. Les Tableaux VI, VII et VIII donnent les résultats ainsi obtenus. On peut voir qu'environ un peu plus de 78 % des lipides présents dans ces aortes sont extractibles directement avec le solvant de Folch dans les deux groupes d'aortes. Sur les 21 % environ des lipides qui ne sont pas directement extractibles (voir Tableau VI), un peu plus d'1 % sont seulement étroitement associés aux fibres élastiques. Le reste est associé avec le collagène et les glycoprotéines urée-solubles. La fraction des lipides étroitement associée à l'élastine passe de 1,3 % des lipides totaux (et 0,14 mg/g de tissu frais) dans les aortes du groupe I à 1,7 % des lipides totaux (0,2 mg/g tissu frais) dans les aortes

TABLEAU VI

Teneur en lipides des extraits macromoléculaires obtenus par la méthode représentée sur la Figure 16 à partir d'aortes humaines peu pathologiques (groupe I) et à partir d'aortes humaines fortement athéroscléreuses (groupe II).

		Groupe I	Groupe II
Poids du tissu frais étudié, g		42	39
<u>1er extrait</u>	mg/g tissu frais	8,4	10,5
Lipides libres	% du total	78,8	78,5
<u>2ème extrait</u>			
Lipides associés au stroma collagène-élastine	mg/g tissu frais	0,85	1,38
	% du total	8,0	10,3
<u>3ème extrait</u>			
Lipides associés aux macromolécules extractibles à l'urée	mg/g tissu frais	1,26	1,27
	% du total	11,8	9,5
<u>4ème extrait</u>			
Lipides fortement associés à l'élastine	mg/g tissu frais	0,14	0,23
	% du total	1,34	1,7
Lipides totaux, mg/g tissu		10,67	13,42



TABLEAU VII

Distribution des lipides entre le cholestérol libre (CL) et estérifié (CE), les triglycérides (TG), les acides gras libres (AGL) et les phospholipides (PL), en % de lipides totaux (% T) pour les différents extraits lipidiques obtenus à partir d'aortes humaines peu pathologiques (groupe I) et avec une artériosclérose avancée (groupe II).

Extraits lipidiques		CE % T	CL % T	TG % T	AGL % T	PL % T
Lipides libres	AG I °	9,15 %	13,75 %	15,35 %	3,34 %	58,41 %
	AG II	15,71	17,39	14,27	1,00	51,63
Lipides associés avec les macromolécules urée-solubles	AG I	4,69	3,81	7,74	9,78	73,98
	AG II	7,9	7,25	10,01	15,55	59,29
Lipides associés au stroma polymérique non hydrolysé	AG I	14,62	4,05	36,89	22,62	21,82
	AG II	5,79	3,04	29,09	38,64	23,44
Lipides associés avec l'élastine	AG I	15,38	3,42	25,64	36,75	18,81
	AG II	16,33	4,08	18,37	53,74	7,48

(°) Aorte Groupe I

TABLEAU VIII

Composition en acides gras des esters de cholestérol (EC), des triglycérides (TG) et des acides gras libres (AGL) de la fraction lipidique fortement associée à l'élastine {59}. Les teneurs en acides gras sont données en μg par g de tissu gras. Aortes du groupe I : peu de lésions ; aortes du groupe II : fortes lésions.

Classe d'acide gras	C.E.		T.G.		A.G.L.		TOTAL	
	I	II	I	II	I	II	I	II
11(°)	0,005	0,06	0,04	0,09	0,08	0,12	0,17	0,27
12:0	0,04	0,03	0,07	0,08	0,11	0,27	0,22	0,38
13:1(°)	0,07	0,31	0,21	0,17	0,51	1,01	0,79	1,49
14:0	0,09	0,08	0,46	0,40	0,38	0,95	0,93	1,43
15:0(°)			0,20	0,16	0,21	0,49	0,41	0,65
15:1(°)	0,30	0,37					0,30	0,37
16:0	0,37	0,36	2,00	1,16	2,84	5,84	5,21	7,36
16:1	0,70	0,69	0,79	0,53	0,54	1,27	2,03	2,49
17:1(°)	0,33	0,44	0,11	0,11	0,13	0,37	0,57	0,92
18:0	0,23	0,15	0,45	0,30	1,46	2,93	2,14	3,38
18:1	0,51	0,69	1,86	0,95	1,60	5,10	3,97	6,74
18:2			0,72	0,30	0,15	0,26	0,87	0,56
19:1(°)	0,19	0,51	0,13	0,32	0,29	0,20	0,61	1,03
19:2(°)	0,06	0,23	0,11	0,52			0,16	0,75
20:1	0,07	0,23			0,43	0,39	0,50	0,62
21:1(°)		0,11		1,06	0,54	0,39	0,54	1,56
22:1					0,55	0,35	0,55	0,35
TOTAL	3,01	4,26	7,15	6,15	9,82	19,94	19,97	30,35

(°) déterminés d'après la position du pic sur le diagramme d'élution par G.L.C.



du groupe II. Cette augmentation de 30 % environ (en % de lipides totaux ; et +64 % par rapport au poids de tissu frais) ne concerne pas uniformément toutes les classes de lipides. La fraction des triglycérides et des phospholipides baisse dans cet extrait obtenu à partir de l'élastine purifiée (voir Tableau VII), tandis que la fraction de cholestérol (libre et estérifié) et des acides gras libres augmente. Tout se passe comme si l'élastine accumulait sélectivement le cholestérol et ses esters et les acides gras libres.

Le Tableau VIII montre le spectre des acides gras retrouvés dans les esters de cholestérol, les triglycérides et à l'état d'acides gras libres dans les lipides fortement associés à l'élastine. Ce tableau appelle plusieurs remarques. Tout d'abord, on note la large représentation de tous les acides gras saturés et non saturés, à chaîne paire et même impaire, de C11 à C22. On peut noter aussi l'augmentation importante de plusieurs classes d'acides gras libres entre les aortes du groupe I et II. Il semble qu'avec l'aggravation de la lésion certaines classes d'acides gras augmentent à l'état libre dans l'élastine. Or, il a été montré par KAGAN et FRANZBLAU (39) que la saturation par les acides gras de l'élastine potentialise l'action de l'élastase pancréatique sur celle-ci. Avec l'augmentation de la saturation en acides gras, on doit donc s'attendre à une augmentation de la vitesse d'élastolyse.

L'augmentation de la teneur en cholestérol libre et estérifié dans l'élastine, avec la progression de la lésion artériothéroscléreuse, pourrait avoir des effets analogues. De plus, il a été montré par HORNEBECK et PARTRIDGE {54} que la fixation du cholestérol sur l'élastine potentialise la fixation du calcium.

Le modèle proposé pour l'élasticité entropique de l'élastine (Fig. 14) prévoit une baisse, voire la perte, de l'élasticité avec la désorganisation des interactions hydrophobes de l'élastine. Or, la fixation des lipides, la saturation des chaînes peptidiques par des acides gras, le cholestérol et ses esters, aura exactement cet effet. Avec l'annihilation du jeu d'entropie, basé sur l'exclusion de l'eau et sa restructuration au rythme de la distention des chaînes peptidiques, l'élasticité entropique de l'élastine doit diminuer, voire disparaître. Cette prédiction a été vérifiée récemment par KAGAN et FRANZBLAU (49). Le modèle que nous avons proposé en 1962 paraît donc rendre compte de ces phénomènes. La perte d'élasticité et la rapide dégradation par les élastases de l'élastine sont donc les conséquences de la saturation croissante avec des lipides des fibres élastiques. La forte et sélective affinité de l'élastine pour certains lipides explique donc la perte continue de ses propriétés rhéologiques et sa lyse rapide en fonction de l'âge et l'accélération de ces phénomènes avec la progression de l'artériosclérose.

Des études similaires ont été effectuées par KRAMSCH et HOLLANDER sur l'aorte humaine avec des résultats qui confirment les nôtres sur tous les points (50-52).

5°/ Conclusions

L'étude de la cinétique de l'hydrolyse alcaline de l'élastine a permis de mettre en évidence l'importance des interactions hydrophobes dans l'élastine et de proposer une théorie "hydrophobe" pour expliquer son élasticité du type entropique. Cette méthode simple et reproductible a rendu possible aussi la préparation des peptides hydrosolubles et coacervables d'élastine (ou κ -élastine) nécessaires pour des expériences d'immunisation et utilisés en tant que substrat pour le dosage d'élastases tissulaires.

Les propriétés hydrophobes de l'élastine, mises en évidence au cours de ces études, ont conduit à l'utilisation de solvants aqueux-organiques pour l'extraction et la purification de la tropoélastine.

A part ces résultats méthodologiques, le modèle proposé pour expliquer les propriétés mécaniques et biologiques de l'élastine a donné satisfaction dans la mesure où il a permis de prédire :

a) la forte affinité de l'élastine pour les lipides ; b) la perte de son élasticité par saturation avec les lipides ; c) l'accélération de l'élastolyse par saturation lipidique. De plus il a permis de proposer une explication moléculaire pour l'élasticité entropique de l'élastine basée sur l'interaction entre l'eau et les régions hydrophobes de l'élastine. Ce modèle, représenté schématiquement sur la Figure 14, rend ainsi compte des propriétés biologiques essentielles de l'élastine, y compris son altération au cours du vieillissement et au cours de l'artériosclérose.

B- STRUCTURE DE L'ELASTINE

ET MODE D'ACTION DES ELASTASES

1°/ Adsorption de l'élastase sur l'élastine

Nous avons souligné la très grande résistance physique et chimique de l'élastine. Néanmoins, au cours du vieillissement et de l'artériosclérose, elle se fragmente et finit par disparaître. Ce phénomène d'élastolyse progressive rend intéressante et opportune l'étude du mécanisme de la dégradation enzymatique de l'élastine réticulée. L'élastine résiste à la plupart des protéases connues, telles que la trypsine, la chymotrypsine, bien que celle-ci et la pepsine la dégradent lentement.

La première enzyme protéolytique ayant une forte affinité pour l'élastine, l'élastase pancréatique, a été découverte, isolée et étudiée par BANGA et BALO dans les années 50 (17,18). Cette enzyme a été cristallisée, sa structure tridimensionnelle et sa séquence en acides aminés déterminées (SHOTTON *et al* (19-21)).

L'élastase pancréatique possède une grande affinité pour l'élastine, ce que nous avons pu mettre en évidence en montrant qu'elle s'adsorbe en solution à l'élastine fibreuse, même à des pH

éloignés de son pH optimum, comme par exemple à pH 4,5 (2). Une telle expérience typique est représentée sur la Figure 17 qui montre la vitesse d'élastolyse dans une suspension d'élastine après l'adsorption sur les fibres élastiques de l'enzyme à pH 4,5, suivie de lavage et de resuspension à pH 8,6.

Cette expérience est effectuée de la façon suivante : 50 mg d'élastine, purifiée par la méthode de LANSING, sont mis en suspension dans un tampon acétate 0,01 M pH 4,5 à 37°C. A cette solution on ajoute des quantités croissantes d'élastase pancréatique cristallisée. On met à agiter pendant 15 minutes, on centrifuge et on lave avec le même tampon, puis on détermine la vitesse d'hydrolyse de l'élastine ainsi lavée, remise en suspension dans un tampon tris-HCl 0,1 M pH 8,6. En effectuant de telles expériences avec des quantités croissantes d'enzymes, on obtient la courbe de saturation représentée sur la Figure 17. On peut voir qu'en augmentant la quantité d'élastase mise en oeuvre, on augmente la vitesse d'hydrolyse de l'élastine resuspendue jusqu'à une certaine limite, ensuite la courbe s'infléchit. Ce plateau est dû à la saturation de l'élastine par l'élastase. On peut calculer la quantité d'élastase pancréatique capable de saturer une quantité donnée d'élastine d'après de telles courbes de saturation. Cette quantité est égale à environ 50 µg d'élastase par mg d'élastine. Connaissant le poids moléculaire et la dimension d'une molécule d'élastase, calculée d'après les diagrammes aux rayons X par SHOTTON (19) (50 x 40 Å), on peut

Figure 17

Vitesse initiale de la "solubilisation" ou "dispersion" de l'élastine en fonction de la quantité d'enzyme préadsorbée sur les fibres.

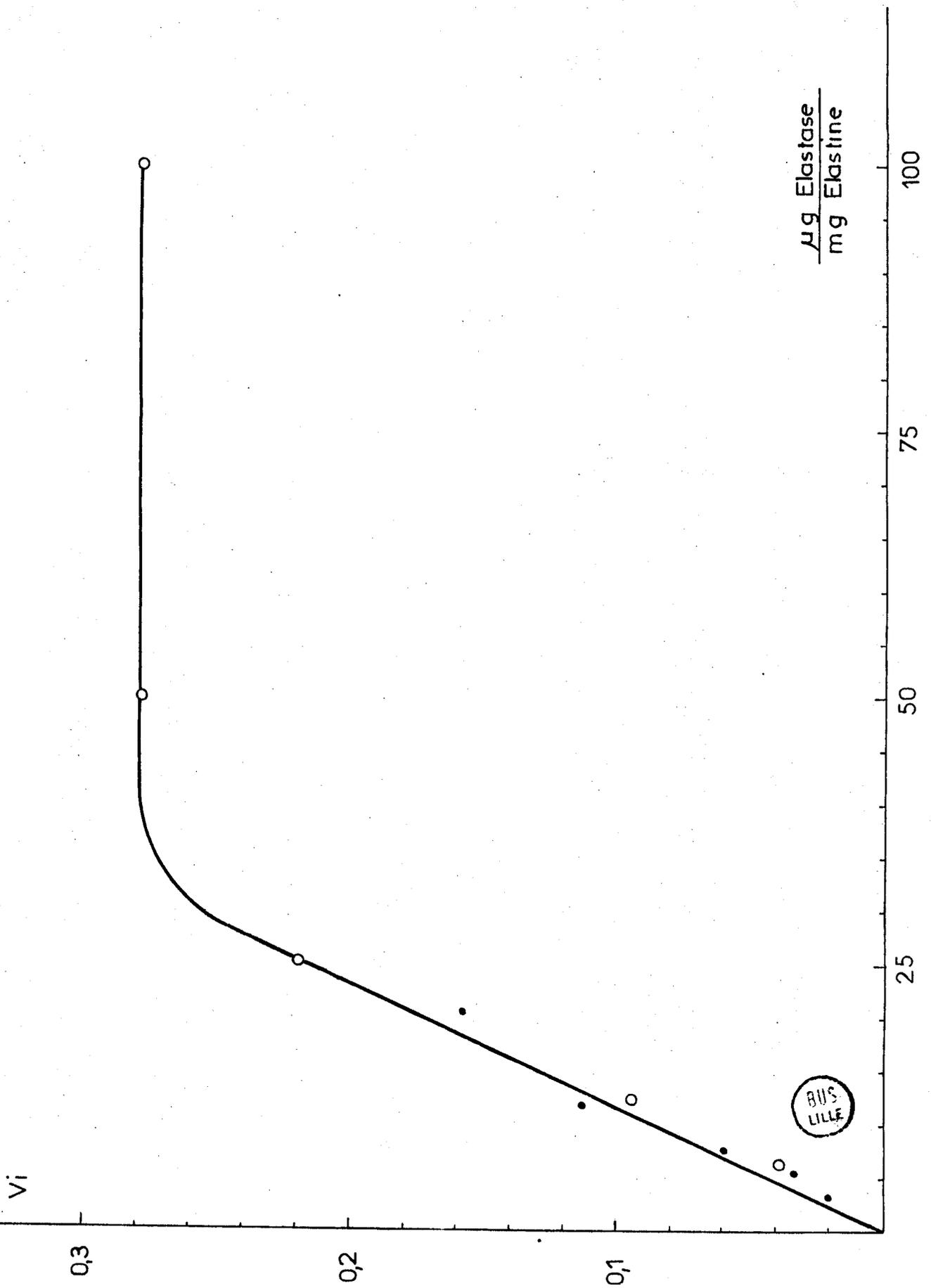
Préadsorption à pH 4,5, hydrolyse à pH 8,6 et à 37°C.

o et ● représentent deux expériences différentes.

Abcisses : μg élastase pancréatique préadsorbée par mg élastine.

Ordonnées : vitesse initiale d'hydrolyse (mg élastine "solubilisée" par minute).

D'après {42}.



calculer également la surface disponible sur les fibres d'élastine d'après les isothermes d'adsorption au Krypton (voir Tableau IV et réf {19, 29}). Ces études ont permis d'estimer à 2,0 à 4,0 m²/g la surface spécifique de l'élastine fibreuse par adsorption de Krypton-85 ou de tert.-butanol. La valeur mesurée dépend de l'échantillon et de la méthode de purification utilisée (29).

En utilisant ces paramètres, on peut estimer à environ 23 m² la surface occupée par l'élastase à saturation. Une autre estimation, basée sur les mesures de TSUK et OSTER (53) sur la trypsine, donne environ 11 m² occupés par l'enzyme à saturation (50 µg).

Le décalage entre l'aire couverte par l'enzyme à saturation (11 - 23 m²/g) et l'aire mesurée au Krypton-85 de l'élastine (2 - 4 m²/g) peut être interprété de plusieurs façons : tout d'abord, il s'agit d'estimation basée sur des mesures dont la précision laisse à désirer à cause de sources d'erreurs inhérentes à la variabilité de la méthode de préparation de l'élastine, à l'influence de traces d'eau au cours des mesures, à la nature approximative de l'isotherme BET qui sert pour les calculs de surface, etc. Ensuite, il faut remarquer qu'à faible taux de saturation (voir la partie linéaire de l'isotherme d'adsorption de la Figure 17), la vitesse de l'élastolyse est proportionnelle à la quantité d'enzyme adsorbée. Au cours de cette phase linéaire, l'aire couverte par l'enzyme varie de 0,2 à 5 m²/g, donc a des valeurs compatibles avec les estimations de la surface spécifique

de l'élastine et correspondant à un degré d'occupation de 5 à 100 % de sa surface. On peut donc admettre que, pour de faibles quantités d'enzyme, il existe des sites d'adsorption à haute affinité assurant une grande efficacité à la réaction enzymatique.

Ces considérations suggèrent l'existence de sites d'adsorption spécifiques à la surface de l'élastine, sites qui peuvent correspondre à certaines parties de la fibre, par exemple à des parties polaires. Afin de contrôler cette hypothèse, nous avons effectué des expériences de blocage des groupements carboxyliques par diazotation avec le diazo-méthane. L'élastine séchée et purifiée par la méthode de LANSING, est traitée pendant 15 minutes au diazo-méthane et, ensuite, soigneusement lavée à l'acétone et séchée. Cette élastine est mise en présence d'élastase dans une expérience comparable à celle précédemment décrite et, ensuite, on détermine son hydrolyse, c'est-à-dire la quantité d'élastase absorbée comme ci-dessus.

On a pu ainsi constater que l'élastine diazotée n'absorbe plus l'élastase. Nous pouvons en conclure que certains groupements carboxyliques de l'élastine sont très probablement impliqués dans la fixation de l'enzyme à sa surface.

Des résultats identiques ont été obtenus par GERTLER en utilisant d'autres techniques (54). Il ne paraît pas déraisonnable de proposer que certains résidus basiques, situés à proximité du

site actif de l'élastase, soient impliqués dans cette fixation de l'enzyme sur l'élastine.

2°/ Cinétique d'hydrolyse de l'élastine

Afin de comprendre dans ses détails la réaction entre élastine et élastase, nous avons effectué des études cinétiques en utilisant l'élastine marquée à l'Iode-131 ou à l'Iode-125. Ce marquage est effectué essentiellement par la méthode de GREENWOOD *et al.* (55). A l'élastine en suspension dans un tampon phosphate mélangé de tert.-butanol {14} on ajoute l'iodure de potassium- ^{131}I ou ^{125}I et de chloramine T ; après 15 minutes de réaction dans la glace sous forte agitation, on ajoute un excès d'iodure de potassium et on dialyse pendant une semaine contre l'eau courante. On effectue ensuite de nombreux lavages à l'eau puis à l'acétone, et on sèche l'élastine ainsi traitée.

Avant l'utilisation, on effectue à nouveau de nombreux lavages afin de débarrasser l'élastine de toute trace d'isotope adsorbé. L'élastine ainsi obtenue peut servir pour des dosages d'activité élastasique selon la technique suivante : 10 mg de cette élastine iodée sont mis en suspension dans un tampon tris-HCl 0,1 M, 4,5 ml et l'enzyme à tester est ajoutée dans un volume final de 0,5 ml. La suspension est placée dans un bain-marie à agitation continue à 37°C et des échantillons de 0,5 ml sont prélevés

après 1 heure et 2 heures d'intervalle. L'échantillon est filtré sur papier Whatman N° 50 ; le filtre est lavé 3 fois avec 1 ml d'eau distillée et on détermine au compteur à cristal puits la radioactivité de l'échantillon {14}.

On peut ainsi tracer des courbes d'hydrolyse, la radioactivité dans le filtrant indiquant la quantité de peptides détachés des fibres par l'activité de l'enzyme. Les activités élastasiques ainsi obtenues sont en bonne corrélation avec celles mesurées par notre technique précédemment décrite et utilisant une élastine colorée par une méthode de diazotation {1}.

3°/ Interprétation de la phase de latence

La Figure 18A montre la cinétique d'hydrolyse d'une quantité constante d'élastine par des quantités croissantes d'élastase. On peut noter sur toutes ces courbes une phase de latence, suivie d'une phase approximativement linéaire, puis d'une phase d'activité décroissante. Cette cinétique est comparable à celle observée avec d'autres élastines, soit natives, soit marquées avec des colorants. On peut interpréter cette cinétique comme suit : au cours de la phase de latence, l'enzyme adsorbée dégrade un nombre limité de liaisons peptidiques dont le clivage est nécessaire pour détacher des peptides hydrosolubles en les clivant entièrement du réseau tridimensionnel d'élastine. Dans la phase linéaire, ce clivage d'un nombre limité de liaisons

Figure 18

Cinétique de l'élastolyse.

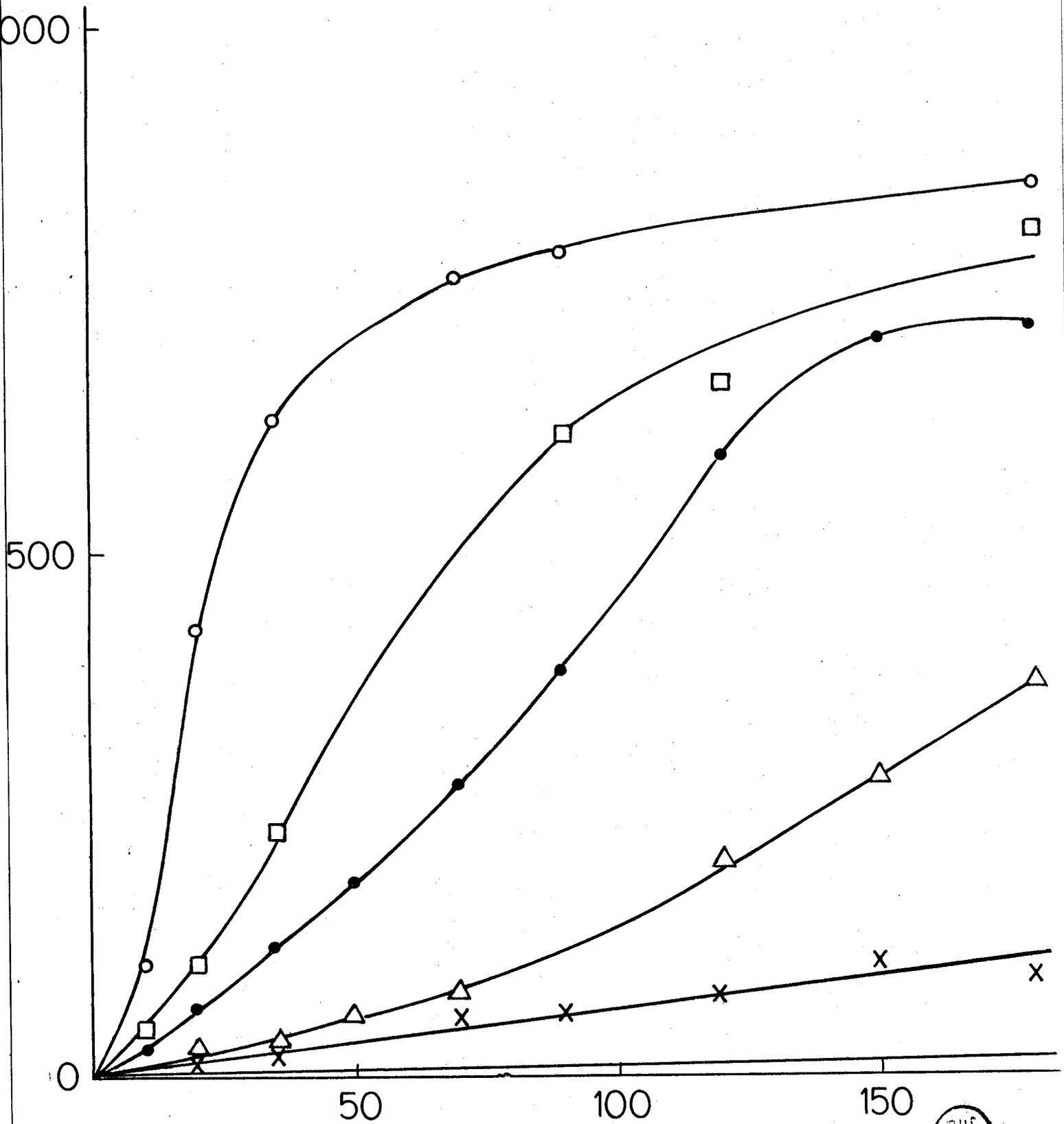
(a) Cinétique d'hydrolyse de l'élastine marquée à l'iode radioactive (^{131}I). Noter les temps de latence au début des courbes.

- sans enzyme ; x—x 10 μg ; Δ 20 μg ; o 50 μg ;
100 μg ; o 200 μg elastase pancréatique {14}.

Abscisses : temps d'incubation

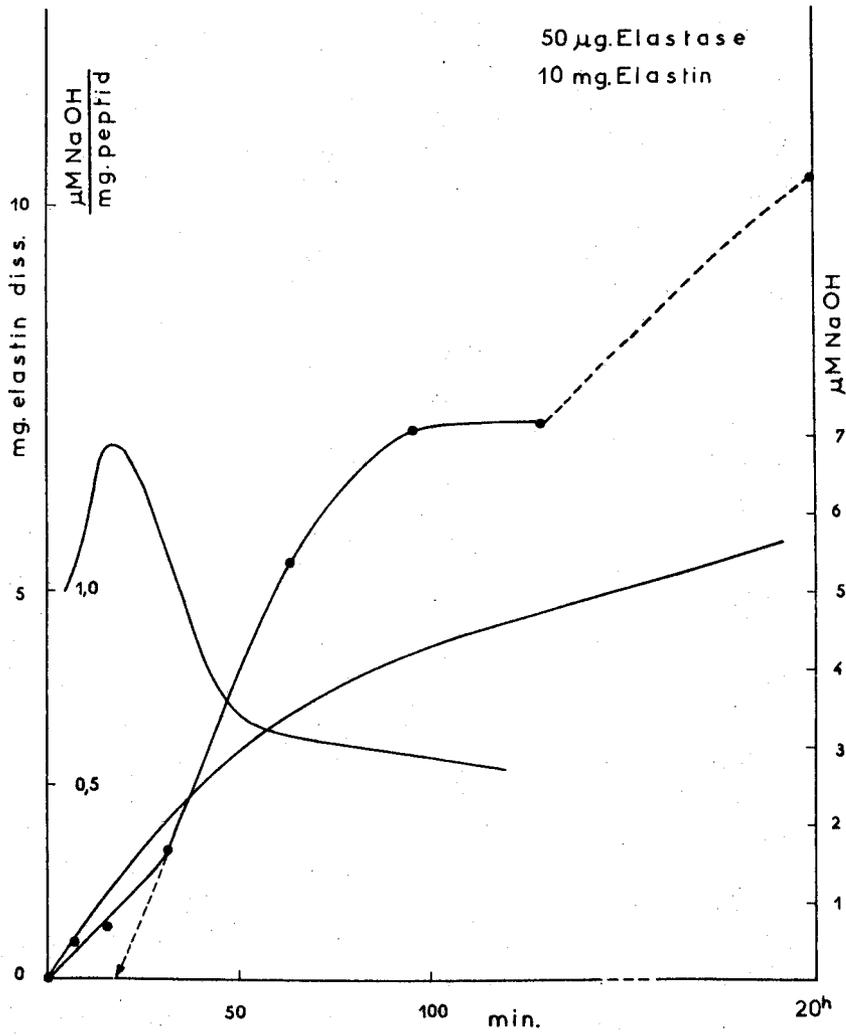
Ordonnées : radioactivité des peptides libérés (cpm/ml)

(b) Cinétique d'élastolyse suivie par gravimétrie (o—o) et par titrigravimétrie (courbe continue) et rapport des deux cinétiques (courbe avec maximum).



BHS
LILLE

18 b



peptidiques est immédiatement suivi de solubilisation de ces peptides, et dans la phase de saturation, la décroissance de la quantité de substrat limite la vitesse de la réaction. Le titrage, au pH-stat, des protons libérés pendant la phase de latence a permis de confirmer cette interprétation. La Figure 18/B montre que la cinétique de l'élastolyse enregistrée au pH-stat ne montre pas de phase de latence. Le rapport entre le nombre de liaisons rompues (titrigraphe) et la quantité d'élastine solubilisée (gravimétrie, biuret ou libération de peptides marqués à l'iode) accuse un maximum à la fin de la phase de latence (voir Figure 18) pour diminuer ensuite. Cette courbe permet d'estimer à environ 10-12 le nombre de liaisons peptidiques rompues pendant la phase de latence pour 100.000 g d'élastine. Pendant cette phase, l'enzyme reste solidement "accrochée" à son substrat comme le montrent les expériences qui seront relatées dans la section suivante. Il est probable que la rupture de ces 10 à 12 liaisons peptidiques provoque une modification suffisante de la conformation du substrat pour changer l'allure de l'hydrolyse et aussi pour faciliter à l'enzyme le départ de son substrat par diffusion.

Ces 10 à 12 liaisons pour 100.000 g d'élastine représentent le nombre critique de liaisons peptidiques à rompre, afin que les clivages successifs résultent immédiatement dans la libération de peptides détachables et solubles dans le milieu réactionnel. Qu'il en soit ainsi est démontré par la cinétique d'hydrolyse

au titrigraphe de la κ -élastine, c'est-à-dire des peptides solubles dans le tampon aqueux. Cette cinétique est quasi linéaire ; il manque entièrement la phase de latence que l'on observe avec l'élastine fibreuse. Ceci confirme que cette phase de latence est attribuable d'une part à l'adsorption de l'enzyme sur l'élastine fibreuse et ensuite à une protéolyse limitée de la région adjacente aux sites d'adsorption. Cette hydrolyse limitée résulte probablement d'une modification de la conformation de la protéine telle que les attaques hydrolytiques suivantes peuvent détacher et solubiliser des peptides hydrosolubles à partir de l'élastine fibreuse.

4°/ Thermodynamique de l'action élastine-élastase

En mesurant la vitesse de la réaction enzymatique avec l'élastase pancréatique à différentes températures, nous avons pu estimer l'énergie d'activation de la réaction d'hydrolyse. Cette valeur est de 11960 cal. {33, 67}. Cette valeur est comparable à celle estimée pour d'autres réactions protéolytiques et nettement plus faible quant à la valeur de l'enthalpie d'activation que celle mesurée pour l'hydrolyse alcaline en présence de plusieurs alcools relativement "efficaces" pour accélérer l'hydrolyse par la potasse 1 M.

Ces résultats suggèrent donc que le mécanisme catalytique lui-même, c'est-à-dire l'action de l'élastase sur l'élastine fibreuse,

ne diffère pas d'une façon fondamentale des réactions catalysées par d'autres protéases. Ainsi, les données énergétiques concernant la trypsine et la chymotrypsine, avec des substrats synthétiques ou naturels, sont comparables à celles obtenues pour l'interaction élastine-élastase.

5°/ Mesure de la vitesse de diffusion de l'élastase d'une fibre d'élastine à l'autre

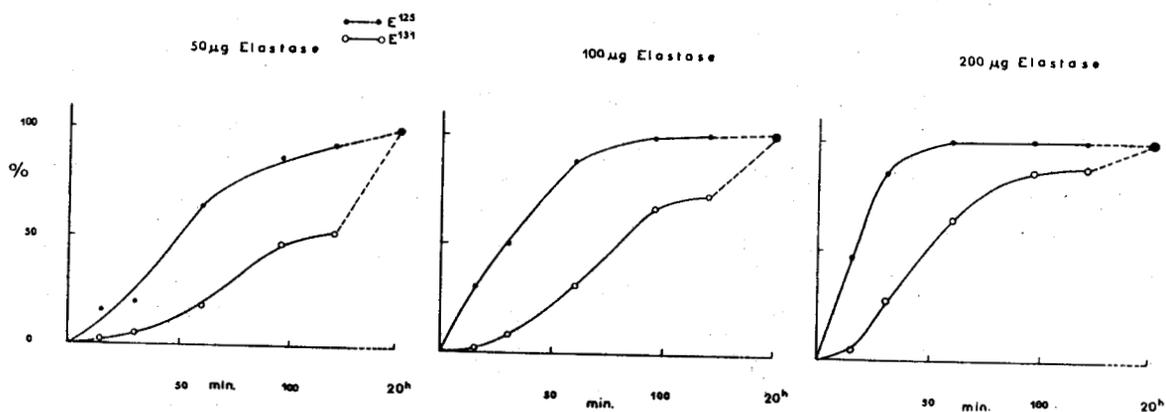
Nous avons donc vu que l'élastase s'adsorbe sur son substrat, très probablement sur des sites spécifiques constitués par des groupements carboxyliques. Au cours de la phase de latence, un certain nombre de liaisons peptidiques sont rompues, probablement dans le voisinage immédiat du site d'adsorption, ce qui permet ensuite, par des réactions hydrolytiques successives, de détacher des peptides solubles à partir de l'élastine fibreuse. Ce mécanisme suppose une action de l'élastase en phase adsorbée et non pas en solution, c'est-à-dire que le mécanisme protéolytique doit se manifester pendant que l'élastase est adsorbée sur son substrat. Cette adsorption est probablement obtenue par la présence de forces spécifiques entre la surface de l'élastase comportant son site actif et des parties de la fibre d'élastine comportant des groupements carboxyliques dans une complémentarité à la surface de l'élastase comportant le site actif. Il est d'autre part probable qu'après avoir clivé un certain nombre de

liaisons peptidiques, l'élastine modifie sa conformation et cette modification pourrait amener une diminution, voire une perte de son affinité pour l'élastase. Cette modification de conformation pourrait donc être accompagnée par la dissociation du complexe élastine-élastase.

Afin d'apporter des preuves expérimentales à l'appui de ce modèle, nous avons effectué des expériences d'adsorption-désorption à l'aide de deux types d'élastine fibreuse marquée l'une par l'Iode-131, l'autre par l'Iode-125 {18, 42}. L'élastase en quantité croissante est adsorbée sur l'élastine marquée à l'Iode-125 en utilisant le protocole précédemment décrit. A une suspension de 50 mg d'élastine-¹²⁵I on ajoute 10, 50, 100 et 200 µg d'élastase pancréatique dans un tampon acétate 0,1 M pH 4,5 ; après 15 minutes d'agitation à la température ambiante on centrifuge et on lave l'élastine, on la resuspend dans un tampon tris-HCl pH 8,6 0,1 M auquel on a, au préalable, ajouté 50 mg d'élastine marquée à l'Iode-131. Dans le surnageant, on détermine les deux isotopes d'iode et on peut ainsi tracer des cinétiques d'hydrolyse pour les deux types d'élastine : pour l'élastine-¹²⁵I sur lequel l'élastase a été adsorbée et l'élastine-¹³¹I ultérieurement ajoutée. Bien que les deux élastines soient en suspension dans le même tampon, on peut voir sur la Figure 19 que l'élastine-¹²⁵I, sur laquelle l'élastase a été adsorbée, s'hydrolyse beaucoup plus rapidement que l'élastine-¹³¹I ajoutée après lavage à l'adsorbat élastine-¹²⁵I-

Figure 19

Compétition de substrat. L'élastase pancréatique est préadsorbée sur l'élastine- ^{125}I ; après lavage on ajoute l'élastine- ^{131}I et on détermine les peptides libérés des deux élastines dans le surnageant. Le délai entre les deux courbes cinétiques permet de calculer la vitesse de diffusion de l'enzyme d'une fibre à l'autre {18, 42}.



élastase. Néanmoins, après 30 minutes environ, l'élastine-I¹³¹ commence à être attaquée aussi, ce qui montre qu'après un certain temps l'élastase a pu quitter le complexe enzyme-substrat pour s'adsorber sur l'élastine-¹³¹I.

En traçant, en fonction du temps, le rapport Iode-131/Iode-125 on obtient des droites qui montrent que la diffusion de l'élastase de l'adsorbat suit une cinétique linéaire similaire à celle de la phase linéaire de l'hydrolyse de l'élastine par l'élastase après la phase de latence. Ceci rend probable l'hypothèse selon laquelle, au cours de cette phase linéaire de solubilisation, l'enzyme se trouve moins fortement retenue qu'au cours de la phase précédente et qu'elle peut diffuser plus librement de son adsorbat vers d'autres fibres élastiques se trouvant dans le milieu. On peut aussi voir que le temps, pendant lequel l'enzyme se trouve d'une façon solidement adsorbée sur son substrat, diminue avec l'augmentation de la quantité d'enzyme adsorbée sur une quantité constante d'élastine. Il semble donc que le nombre des sites à très forte affinité doit être saturé et les molécules d'enzymes ajoutées en excédent, par rapport au nombre de sites "à forte affinité", sont probablement plus libres pour quitter la fibre et s'adsorber sur d'autres fibres. Ou, encore, il se peut que cette enzyme excédentaire contribue à la dégradation des liaisons peptidiques critiques dont la rupture amène la modification de la conformation de l'élastine, permettant à l'élastase de perdre son affinité très forte pour les fibres élastiques.

Ces expériences ont aussi un corrolaire biologique important car elles montrent que des élastases, ayant une spécificité d'adsorption pour les fibres élastiques, peuvent rester longtemps actives, même à faible concentration, car elles agissent en phase d'adsorption. C'est-à-dire, qu'une fois mises en présence avec des fibres élastiques dénudées, elles s'y adsorbent et peuvent continuer leur activité protéolytique pendant un temps assez long pour dégrader l'élastine. Ainsi, de faibles quantités d'élastase libérées dans les tissus pourraient faire des dégâts considérables en dégradant, d'une façon continue, les fibres élastiques sur lesquelles l'enzyme est adsorbée.

Ce modèle du mécanisme d'action des élastases (hydrolyse en phase hétérogène) est représenté sur la Figure 20.

6°/ Elastases cellulaires et tissulaires

Les expériences ci-dessus décrites montrent l'importance des élastases dans la dégradation des fibres élastiques. A part les deux types d'élastases pancréatiques récemment individualisées (56,57) d'autres élastases ont été isolées et partiellement caractérisées (22, 58-62).

Bien que l'élastase pancréatique puisse être considérée comme un modèle intéressant à étudier pour la compréhension du

Figure 20

Représentation schématique de la séquence de l'adsorption de l'élastase sur l'élastine et de son hydrolyse par l'enzyme adsorbée.

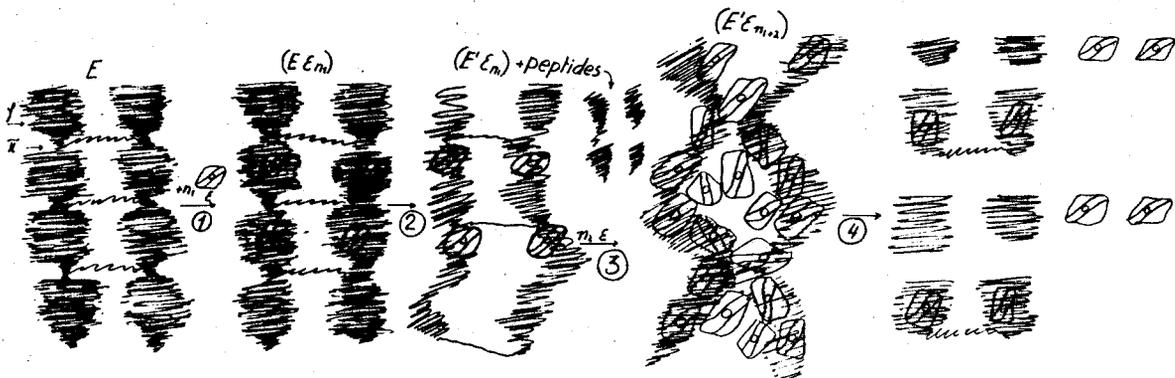
E : Elastine native, comportant des régions hydrophobes (ⓧ) étroitement repliées et des régions plus hydrophiles (Ⓢ) comportant les liaisons intercaténares.

Réaction N° 1 : n_1 molécules d'élastase (ϵ) se fixent sur des sites accessibles à la surface de la molécule native (fonctions carboxyliques), formant le complexe enzyme-substrat ($E\epsilon_{n1}$).

Réaction N° 2 : à la suite d'une protéolyse limitée, la conformation des fibres change, les régions hydrophobes se relâchent et de nouveaux sites de fixation deviennent accessibles. Ce complexe enzyme-substrat modifié est désigné ($E'\epsilon_{n1}$). Ce processus a lieu pendant la phase de latence de la réaction enzymatique et s'accompagne par la libération d'une faible quantité de peptides.

Réaction N° 3 : de nombreuses autres molécules d'enzyme peuvent maintenant se fixer sur les fibres modifiées formant le complexe enzyme-substrat $E'\epsilon_{n1} + 2$.

Réaction N° 4 : ce complexe subit rapidement l'attaque hydrolytique de l'élastase avec libération de peptides solubles dans le milieu et la "désorption" de molécules d'élastase pouvant s'attaquer à d'autres fibres.



mécanisme d'action des élastases en général, il paraît probable que d'autres élastases, comme celles isolées à partir des leucocytes (58), des macrophages (60), des plaquettes {13, 69} et de l'aorte {55}, jouent un rôle aussi important, ou même plus important, en pathologie. Au cours du vieillissement et de la dégradation des fibres élastiques dans la paroi artérielle ou dans d'autres tissus, ces élastases cellulaires et tissulaires peuvent jouer un rôle déterminant. C'est pourquoi nous avons décidé de nous occuper plus particulièrement de ces élastases cellulaires et tissulaires.

Nous avons décrit récemment la purification et les propriétés d'une élastase extraite à partir de la paroi artérielle {43, 55}. Une élastase purifiée à partir des plaquettes sanguines a été également obtenue par B. ROBERT en collaboration avec l'équipe du Professeur J. CAEN et Yves LEGRAND {13, 23, 24, 26, 30, 35, 51, 52}.

La mise en évidence de l'élastase de l'aorte a été rendue possible grâce à une méthode très sensible de dosage de l'élastase {43}.

a) Mise en évidence, purification et propriétés d'une élastase plaquettaire

La lente fragmentation et dégradation des fibres élastiques est le signe le plus généralement rencontré au cours du vieillissement

et des modifications artérioscléreuses de la paroi artérielle. De nombreux auteurs ont attribué à ces modifications un rôle prioritaire dans ces deux phénomènes si difficiles à dissocier, c'est-à-dire le vieillissement de la paroi et l'apparition des plaques d'athérome. Or, le mécanisme exact de ces dégradations est resté inconnu. La découverte de l'élastase pancréatique par BANGA et BALO a suggéré à plusieurs auteurs l'hypothèse que, finalement, cette élastase pourrait bien être responsable de la dégradation des fibres élastiques, en admettant qu'elle puisse, par un mécanisme qui reste à être précisé, se résorber du duodénum pour arriver dans la circulation et pénétrer dans la paroi artérielle. L'une des deux élastases pancréatiques a été récemment mise en évidence dans le sang (63) et l'élastase isolée à partir de l'aorte porcine donne une réaction immunologique d'identité partielle avec l'élastase pancréatique. Cette hypothèse ne peut donc pas être exclue et mérite d'être étudiée de plus près.

Il nous paraissait logique d'admettre que l'élastase, responsable de la dégradation de la paroi artérielle, soit produite soit directement dans la paroi, soit apportée par le flux sanguin. Dans ce deuxième cas, elle pouvait être d'origine plasmatique, sérique ou d'origine cellulaire. Les études de JANOFF ont apporté des arguments à l'appui de l'existence d'une élastase leucocytaire. Cette élastase a été purifiée et caractérisée par OLSSON et OLSSON (59). Nous-mêmes, nous nous sommes attachés avec

B. ROBERT, J. CAEN et Y. LEGRAND à l'étude d'une autre source possible : les plaquettes sanguines.

On connaît le rôle important que l'on a attribué aux plaquettes sanguines dans la genèse de l'athérosclérose. La théorie, dite thrombogène, de l'athérosclérose propose que chaque plaque d'athérome se forme à la place d'un thrombus muralisé. Cette théorie n'a pas eu de confirmation convaincante, car de nombreuses plaques n'ont pas de précurseurs plaquettaires dans la paroi. Il était plus logique d'admettre que les plaquettes sanguines puissent contribuer d'une autre façon à la genèse de l'artériosclérose, par exemple en apportant une enzyme lytique responsable de la dégradation localisée des fibres élastiques, telle qu'on l'observe en histologie. Nous avons, en effet, réussi à extraire et à purifier une protéase à activité élastolytique à partir des plaquettes sanguines humaines {13, 51, 52}. Cette méthode implique l'extraction des plaquettes avec un tampon en présence de Triton-X-100, suivie de la précipitation à 40 puis à 70 % de saturation au sulfate d'ammonium. L'élastase active se trouve dans le précipité à 70 % de saturation, tandis qu'une pro-élastase un zymogène, a été mise en évidence dans le précipité à 40 % de saturation {52}. L'enzyme a été purifiée par passage sur colonne de Sephadex G-200, suivie d'isofocalisation préparative en gel d'acrylamide. L'étude sur cette élastase plaquettaire forme l'objet de la thèse d'Etat de Mr Yves LEGRAND {69}.

L'existence d'une élastase artérielle a été signalée par LOEVEN (64) mais la méthode qu'il a utilisé n'a pas permis de convaincre les chercheurs car elle est insuffisamment sensible et précise pour mettre en évidence une activité faible sur des fibres élastiques. Même nos méthodes, beaucoup plus sensibles, utilisant l'iode radioactive fixée sur l'élastine, n'ont pas permis la mise en évidence d'une telle activité. Nous avons essayé, en vain, de trouver cette enzyme par des méthodes autres que celle qui sera brièvement décrite et qui a permis, en effet, d'isoler et de caractériser cette élastase (43). Cette méthode est basée sur la préparation des gels contenant dans un milieu agarose de la κ -élastine, substrat qui est sélectivement clivé par l'élastase et, très lentement, par les autres protéases. Les plaques d'agarose κ -élastine sont ensuite mises à incuber dans une chambre humide après avoir déposé dans des godets 5 μ l de la solution enzymatique à étudier. Après 1 à 6 heures d'incubation, on fixe les plaques dans l'acide trichloracétique à 5 % ; on les lave dans l'acide acétique 1 % ; on évalue sur des agrandissements photographiques le diamètre des plages de lyse. L'activité enzymatique de la solution à étudier est lue sur des courbes d'étalonnage préparées avec des quantités connues d'élastase pancréatique cristallisée. Cette méthode est assez rapide et sensible et permet de mettre en évidence des enzymes protéolytiques possédant une forte activité pour des peptides hydrophobes dérivés de l'élastine, même si ces enzymes ne sont pas très actives sur l'élastine fibreuse. Des substrats synthétiques

tels que ceux de BIETH ou de BLOUT ont été également utilisés pour la caractérisation de l'élastase aortique {55}.

b) Propriétés de l'élastase artérielle

Nous avons préparé des extraits au NaCl 0,9 % ou au PBS de prélèvements aortiques humains au stade athérome 0, I, II et III. Ces prélèvements, contenant entre 1 et 5 mg/ml de protéines, sont ensuite déposés dans les godets des plaques d'agarose κ -élastine et, après 1 heure d'incubation, on peut mettre en évidence des plages de lyse (Figure 21). Cette expérience a suggéré la présence d'une protéase élastolytique dans ces extraits d'aorte {43}.

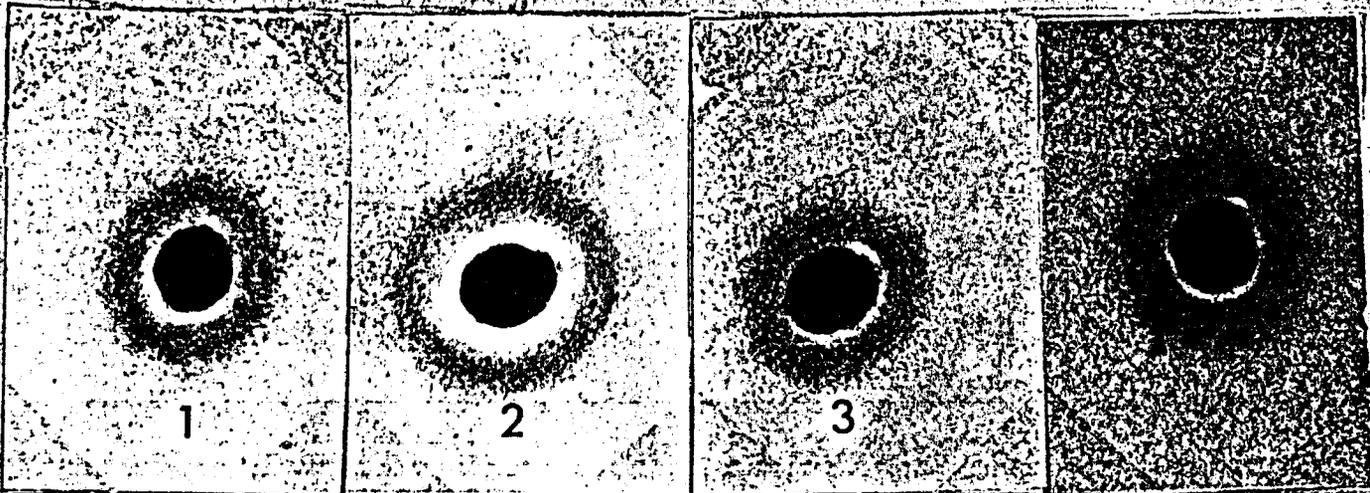
Afin de la purifier, 400 g d'aorte de porc ont été extraits 2 fois de suite avec 1 litre de PBS. La solution est ensuite précipitée au sulfate d'ammonium à 60 %. Le précipité est dissous dans le PBS et passé sur une colonne de DEAE cellulose. L'élution par étape de l'activité enzymatique (déterminée sur plaque de κ -élastine agarose) permet de la récupérer dans des pics distincts {55}. Ces éluats sont ensuite passés sur Sepharose-4B et l'activité élastolytique est récupérée dans le pic II. Sur gel d'acrylamide, en présence de SDS, on peut observer la présence d'une bande donnant un poids moléculaire d'environ 23.000, c'est-à-dire correspondant au poids moléculaire de l'élastase pancréatique {55}.

Figure 21

Méthode de dosage des élastases en gel de κ -élastine-agarose
{43}.

En bas : courbe d'étalonnage avec l'élastase pancréatique
de porc.

En haut : extrait NaCl 0,9 % d'aortes humaines.



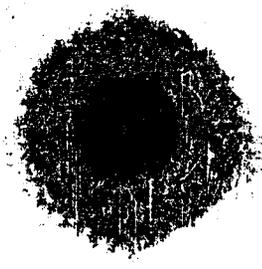
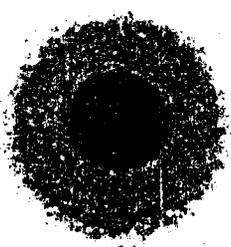
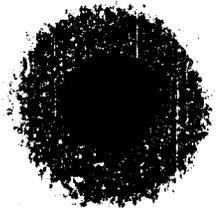
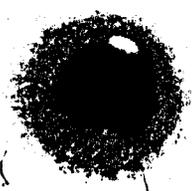
HUMAN AORTA

INTIMA

MEDIA

ADVENTICE I

ADVENTICE II



PANCREATIC ELASTASE

2 µG

4 µG

6 µG

8 µG



L'enzyme ainsi purifiée hydrolyse la κ -élastine, plus lentement l'élastine fibreuse iodée et assez rapidement les substrats synthétiques de BIETH et de BLOUT.

Le Tableau IX montre l'activité de cette enzyme en comparaison avec celle de l'élastase plaquettaire et l'élastase pancréatique. On peut voir que l'élastase de l'aorte est plus active que l'élastase plaquettaire et moins active que l'élastase artérielle. En prenant comme base l'activité sur κ -élastine-agarose, la préparation la plus hautement purifiée correspond à peu près à 95 % de son poids à l'élastase pancréatique cristallisée. En présence d'immun-sérum, obtenu par immunisation de lapin avec l'élastase pancréatique de porc cristallisée (Sigma), on obtient une ligne de précipitation qui donne une réaction d'identité partielle avec l'élastase pancréatique de porc cristallisée (55).

Ces expériences montrent que ces deux enzymes sont probablement très similaires, mais ne paraissent pas être identiques. Ceci ressort d'une part de leur activité différente sur les différents substrats, d'autre part de leur inhibition très différente par les inhibiteurs sériques des protéases. On peut voir sur le Tableau IX que l'élastase aortique est plus fortement inhibée que l'élastase pancréatique par l' α_1 -antitrypsine et surtout par l' α_2 -macroglobuline. Il s'agit donc, très probablement, d'une protéine proche, mais non identique, à l'élastase pancréatique. Il paraît très probable, d'après ces études, que

TABLEAU IX

Comparaison des élastases aortiques et pancréatiques et quelques données sur l'élastase plaquettaire {30, 35, 55}. Les activités sont données en valeur relative (élastase pancréatique = 100) et les inhibitions en %.

Elastase			
Substrat ou inhibiteur	Aorte de porc	Pancreas de porc	Plaquettes humaines
Elastine polymérique	12	100	10 - 20
κ -élastine en gel d'agarose	95	100	(65) [°]
NaC Tri-Ala-O-Me	57	100	49
α_1 -antitrypsine I/E = 0,6 i %	72	33	~ 70 ^{°°}
α_2 -macroglobuline I/E = 0,1 i %	61,4	15	~ 70 ^{°°}
PM . 10 ³	23	25	26

([°]) Extrait plaquettaire partiellement purifié

(^{°°}) Substrat élastine polymérique, E/I ~ 1

Résultats inédits de Y. LEGRAND (communication personnelle)



cette élastase présente dans l'aorte humaine, ainsi que dans celle de nombreuses autres espèces testées (chien, rat, lapin) {43}, est bien l'agent responsable de la dégradation des fibres élastiques qu'on observe avec l'âge et dans l'artériosclérose.

c) Elastase artérielle en fonction de l'âge et de l'athérome

Cette hypothèse est considérablement renforcée par nos récents résultats montrant une proportionalité entre le taux d'élastase et les degrés de lésions d'aortes humaines obtenues par autopsie chez des individus porteurs de lésions de sévérité croissante {61}. La Figure 22 montre l'activité élastasique de l'aorte en fonction du degré d'athérome et de l'âge. Ces deux paramètres déterminent (d'une façon indépendante et additive) une forte augmentation en accord avec les constatations morphologiques.

7°/ Conclusions

Nos études sur la structure de l'élastine et le mécanisme d'action des élastases permettent de dégager un certain nombre de conclusions.

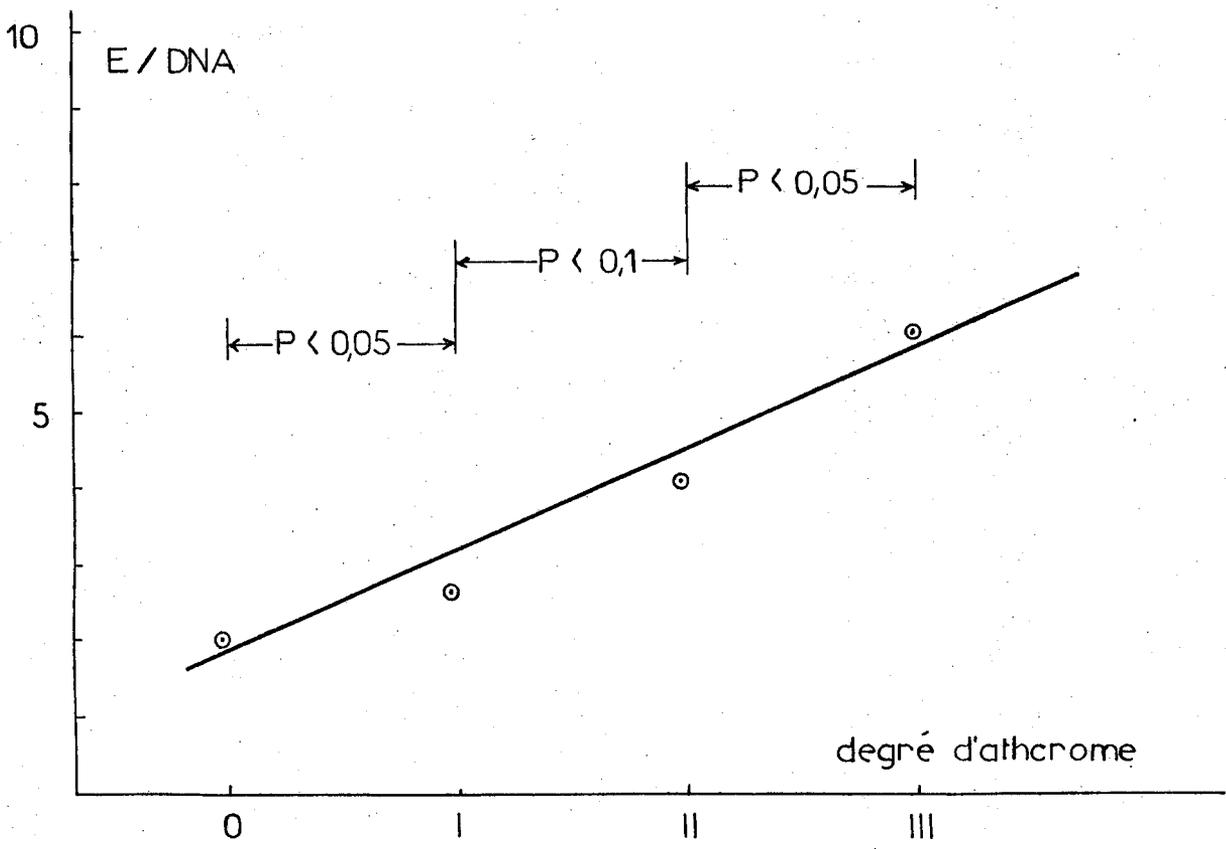
Il semble que l'élastine possède une structure complexe comportant une charpente microfibrillaire avec des molécules de tropoélastine pontées (voir Chapitre C). Ce pontage est effectué par une lysine-oxydase, suivi d'introduction de résidus de desmosine et d'iso-desmosine entre les unités de tropoélastine.

Figure 22

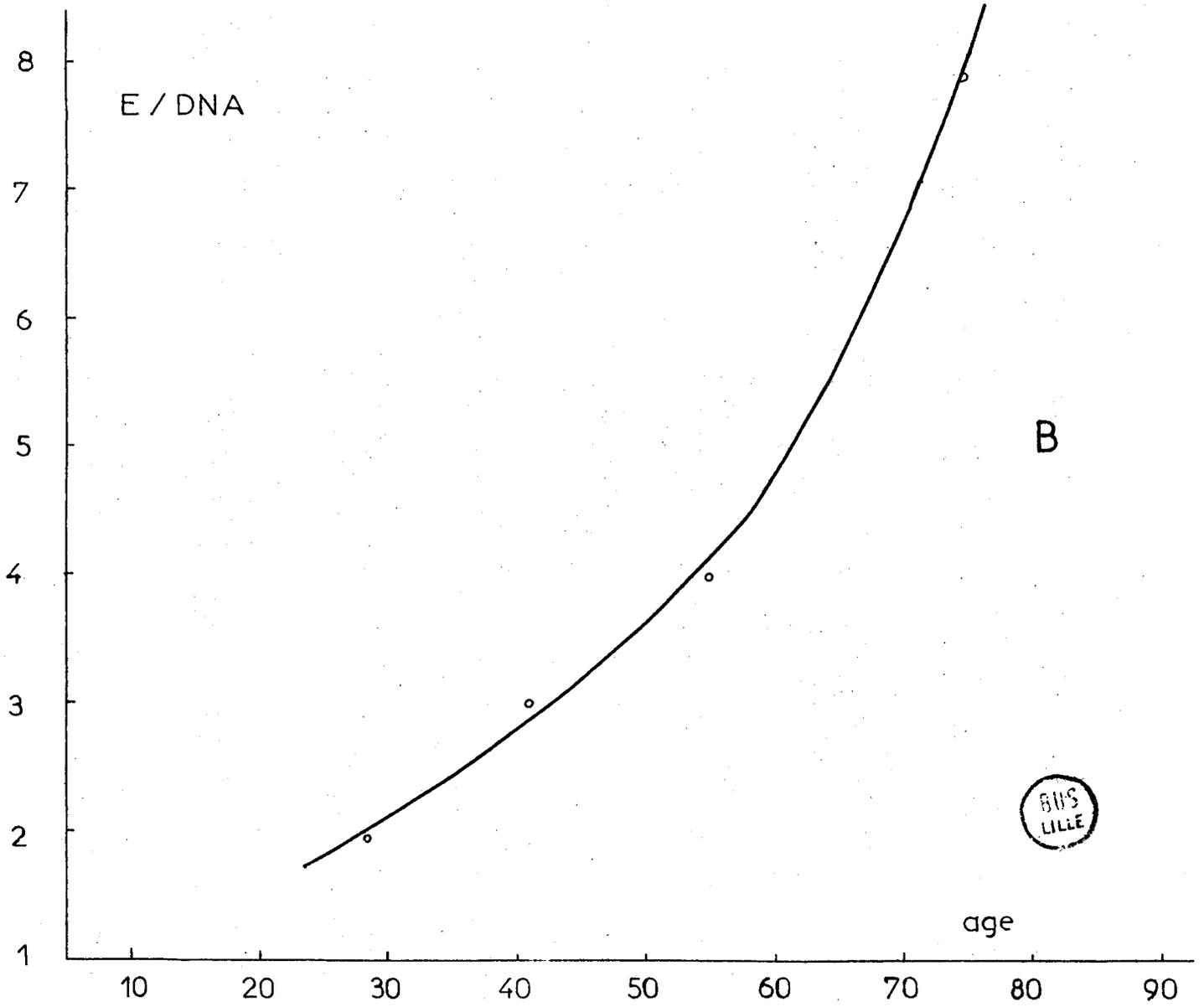
Augmentation de l'activité de l'élastase de l'aorte humaine en fonction du degré d'athérome (A) et en fonction de l'âge des individus (B).

Abscisses : degré d'artériosclérose selon la nomenclature de l'O.M.S. (A)
et l'âge en années (B)

Ordonnées : activité élastasique exprimée en équivalents d'élastase
pancréatique par mg de protéines et par mg de DNA (activité
élastasique par cellule).



A



B



L'élastine posséderait des sites spécifiques de fixation pour l'élastase, des sites comportant des résidus carboxyliques qui peuvent être bloqués par diazotation. La surface spécifique de l'élastine, mesurée par adsorption de Krypton ou d'alcool aliphatique, est de l'ordre de 2 à 5 m² par gramme de fibres et une partie relativement importante de cette surface (jusqu'à 100 %) peut être occupée par l'élastase adsorbée. Ceci montre que les sites d'adsorption sélective sont relativement nombreux sur la fibre. Le reste de la surface peut être également couvert par des molécules d'élastase dont la mobilité est alors plus grande. L'enzyme adsorbée sur des sites sélectifs et spécifiques ne peut quitter ces sites qu'après avoir attaqué environ une dizaine de liaisons peptidiques, modifiant la conformation des fibres élastiques d'une façon suffisante pour diminuer l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

L'enzyme serait alors libre de diffuser à une autre fibre élastique qu'elle pourrait attaquer à son tour.

Ce mécanisme a une importance biologique et physiopathologique considérable, car il explique pourquoi de faibles quantités d'élastase peuvent dégrader d'une façon efficace des fibres élastiques dans les tissus. L'adsorption de l'enzyme sur le substrat rend en effet plus efficace son action même à faible concentration et diminue beaucoup la possibilité d'intervention des inhibiteurs au niveau du complexe enzyme-substrat. Il est

probable que la lente dégradation, fragmentation et lyse des fibres élastiques *in vivo* soit le résultat d'un tel mécanisme. L'isolement et la caractérisation d'une élastase plaquettaire et d'une élastase artérielle (à partir d'aortes humaines et porcines) renforcent considérablement la validité de cette hypothèse et montrent que les enzymes de ce genre sont présentes dans les cellules interagissant constamment avec la paroi artérielle et sont, probablement, les agents catalytiques responsables du vieillissement et de la dégradation du tissu élastique avec l'âge et au cours de l'artériosclérose.

C - LE ROLE DES GLYCOPROTEINES DE STRUCTURE

DANS LA BIOSYNTHESE DE L'ELASTINE

1°/ Introduction

L'étude ultrastructurale de l'élastine au microscope électronique a suggéré, au milieu des années 1960, la présence d'au moins deux types de constituants. L'un était facilement contrasté par l'acétate d'uranyle, le tetroxyde d'osmium ou le rouge de ruthenium ; l'autre paraissait amorphe et transparent aux électrons. Plusieurs auteurs (parmi lesquels Daria HAUST qui mérite une mention spéciale) ont alors proposé une structure composite binaire pour l'élastine (65 - 70). Selon ces auteurs, les fibres élastiques seraient composées d'un élément microfibrillaire et d'un élément amorphe. Daria HAUST a proposé d'appeler cet ensemble "l'unité élastique" ("elastic unit") (65).

Des études morphologiques du développement ontogénétique des fibres élastiques ont montré que le rapport entre ces deux fibres change avec l'âge. Au cours des phases précoces de la morphogénèse, des structures riches en microfibrilles ont été détectées. Avec la maturation, la densité des microfibrilles diminue et la surface relative occupée par les plaques translucides amorphes augmente.

Figure 23

Microscopie électronique de l'élastine, purifiée par la soude, montrant les microfibrilles. Acétate d'uranyl-Pb-O_SO₄. x 50.000.



L'élastine mature présente ainsi l'aspect familier de rubans ou plaques aux contours plus ou moins irréguliers, cernés de microfibrilles ; celles-ci forment, à l'intérieur des lames élastiques, de fins filaments parallèles à l'axe longitudinal des structures élastiques (Figure 23).

Avec le vieillissement, et surtout dans l'aorte artérioscléreuse, la richesse en microfibrilles de l'élastine augmente d'une façon très apparente. MOSCHETTO *et al.* ont pu proposer récemment une estimation de l'âge biologique de l'élastine basée sur le rapport entre ces deux constituants (71).

Ces observations morphologiques ont suggéré une relative indépendance des deux éléments constitutifs de la fibre élastique. Il a pu être montré, en effet, que l'élément microfibrillaire peut être séparé de l'élément amorphe par des méthodes chimiques. Notre laboratoire a activement participé à ces démonstrations. Dans ce chapitre, nous nous proposons de décrire brièvement les principales expériences qui nous ont permis de confirmer la nature glycoprotidique des microfibrilles et d'identifier la composante amorphe à l'élastine réticulée.

2°/ Séparation des composants glycoprotidiques et amorphes de l'élastine

Si on soumet l'élastine purifiée par différentes méthodes (voir Tableau I) à une série d'extractions à l'urée 8 M en présence d'un réducteur de ponts disulfures (2-mercaptoéthanol 0,1 M, dithiothréitol 0,05 M), on peut extraire une partie faible, mais de loin non négligeable, de la protéine. Après dialyse et lyophilisation, on peut soumettre l'extrait à une analyse chimique et physicochimique permettant de caractériser les substances extraites. On peut aussi soumettre l'élastine, ainsi traitée, à une analyse comparative avec l'élastine non traitée. Le Tableau X montre les acides aminés N-terminaux détectés dans deux échantillons d'élastine avant et après extraction par l'urée 8 M-mercaptoéthanol 0,1 M. On peut constater que la quantité d'acides aminés N-terminaux diminue considérablement après ce traitement.

Comme des méthodes drastiques sont utilisées pour la purification de l'élastine, ces résultats auraient pu être attribués simplement à l'extraction de peptides partiellement dégradés et détachés du réseau réticulé de l'élastine polymérique. Il ressort, toutefois, de l'analyse de l'extrait urée-mercaptoéthanol, qu'il n'en est rien.

Le Tableau XI montre la composition en oses de plusieurs préparations d'élastine. Toutes les préparations étudiées contiennent de

TABLEAU X

Résidus d'acides aminés N-terminaux de deux préparations d'élastine avant et après extraction à l'urée 8 M-mercaptoéthanol 0,1 M. L'élastine N° 1 a été purifiée par extraction au TCA à 70 % à froid et l'élastine N° 2 par la soude 0,1 N à 100° (voir Tableau I) (Résultats non publiés, obtenus avec W. HORNEBECK et L. SALO).



Acides aminés N-terminaux	µM acide aminé/g élastine			
	Elastine N° 1		Elastine N° 2	
	avant extraction	après extraction	avant extraction	après extraction
Ala	4,0	1,4	1,0	1,0
Gly	3,4	0,7	1,2	0,5
Autres non-polaires	2,5	0,5	0,4	0,3
Tre	0,7	0,0	0,9	0,4
Ser	0,5	0,0	0,9	0,2
Lys	0,5	traces	0,3	0,4
Asp	0,6	traces	0,8	traces
Glu	0,6	traces	0,8	0,3
TOTAL	12,8	2,6	6,3	3,1

TABLEAU XI

Teneur en hydroxyproline et en oses de plusieurs préparations d'élastine. Les résultats sont exprimés en % du poids sec. Les méthodes de préparation de l'élastine sont données dans le Tableau I (d'après [28]).

% Poids sec

Préparation d'élastine	Hexoses	Hexosamines	Acide sialique	OH. proline
Elastine LLB acide formique	0,49	0,47	0,00	0,89
Elastine LLB TCA	0,84	0,50	0,06	1,00
Elastine LLB autoclavée	0,48	0,47	0,00	0,82
Elastine LLB guanidine	0,83	0,38	0,04	2,80
Elastine LLB NaOH	0,29	0,31	0,00	1,09
Elastine artère humaine NaOH	0,73	0,76	0,11	0,95

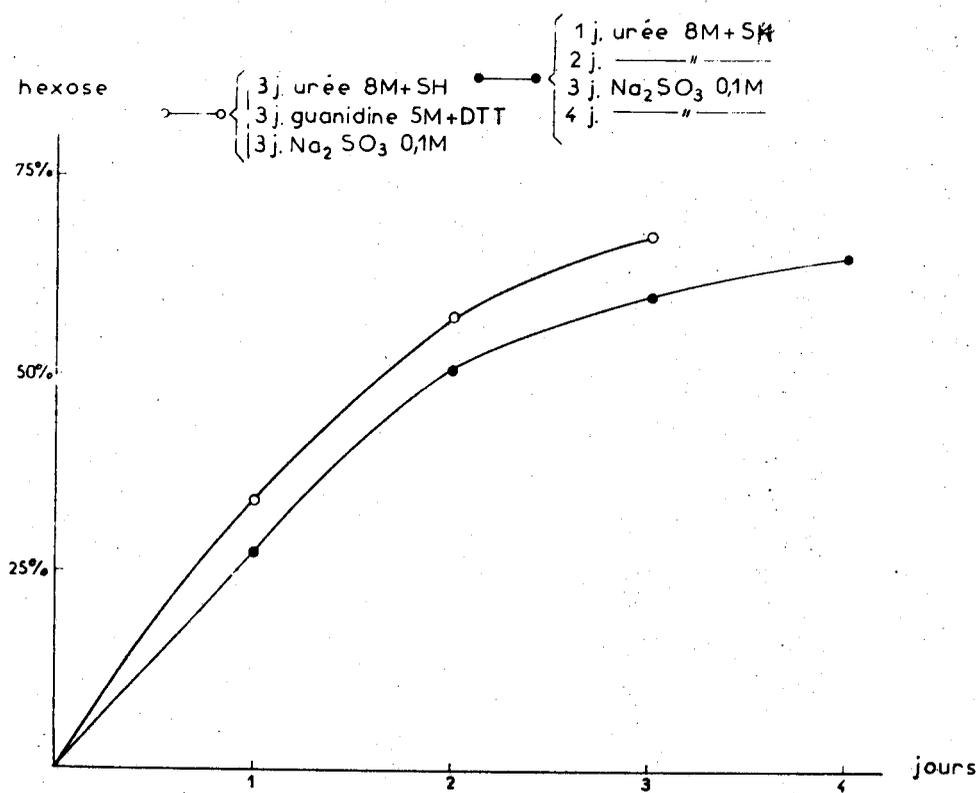


faibles quantités d'hexoses et d'hexosamines. Parfois, l'acide sialique est aussi détectable. La teneur en hydroxyproline n'est élevée que pour une seule préparation (2,8 % ; la teneur généralement acceptée comme "normale" pour l'élastine hautement purifiée est de 0,6 à 1,5 %) excluant pratiquement une forte contamination par le collagène.

La Figure 24 montre que la majeure partie des hexoses sont extractibles par trois à cinq extractions avec l'urée-mercaptoéthanol ou par d'autres solvants analogues comme la guanidine 5 M ou encore le tetrathionate. Il semble donc que cette méthode d'extraction soit sélective et permette de séparer un composant de nature glycoprotidique associé à l'élastine polymérique. Cette constatation a été confirmée par l'analyse d'acides aminés des extraits urée ou guanidine (voir Tableau XII). La composition obtenue est très différente de celle de l'élastine (voir Tableau II), mais ressemble de près à celle décrite antérieurement pour les glycoprotéines de structure isolées à partir de plusieurs tissus {16} (voir Tableau XII). Ces résultats ont suggéré une nature biochimique distincte pour le composant extractible par l'urée-mercaptoéthanol et pour le composant insoluble dans ce solvant.

Figure 24

Extraction des osides à partir d'une préparation d'élastine purifiée au TCA 70 % (Figure 2). Les solvants utilisés sont représentés sur la Figure {28}.



3°/ Les glycoprotéines de structure du tissu élastique

Indépendamment de ces études, nous avons isolé et partiellement caractérisé, à partir de la média de l'aorte de porc, une préparation glycoprotidique que nous avons dénommée les glycoprotéines de structure de l'aorte à cause de leur similitude avec les autres glycoprotéines de structure isolées à partir d'autres organes{71-76}. Ces glycoprotéines représentent une fraction relativement importante des macromolécules de la matrice intercellulaire de l'aorte{10,20}. Ces glycoprotéines forment facilement des associations avec le collagène et les protéoglycannes, ce qui rend leur purification difficile. Les premières préparations ont été obtenues après hydrolyse du stroma de l'aorte par l'acide trichloracétique à 2,7 % pendant 30 minutes à 90°C { 16 } (voir Figure 1). Récemment, nous avons réussi, avec Mme M. MOCZAR, à obtenir des préparations purifiées sans agents hydrolysants { 76 }. Même l'utilisation de la collagénase purifiée ne garantit pas l'intégrité des glycoprotéines isolées. Ces résultats sont consignés dans la thèse d'Ingénieur-Docteur de Mme MOCZAR { 71 } et dans plusieurs notes { 72-77 }.

Deux séries d'expériences indépendantes ont permis de confirmer l'existence de ces glycoprotéines de structure au niveau de la média de l'aorte. D'une part, l'extraction directe avec l'urée 8 M-mercaptoéthanol 0,1 M (voir Figure 1), et l'analyse de l'extrait urée purifié. Cet extrait contient une glycoprotéine

TABLEAU XII



Composition en acides aminés de quelques préparations de glycoprotéines de structure, comparée à la composition de l'extrait urée-mercaptopéthanol de l'élastine à partir d'une élastine purifiée par le TCA à 70° à froid (voir Tableau I et Figure 2). Les résultats sont exprimés en résidu pour 100 résidus totaux. (d'après [28, 72]).

Acide aminé	GPS Aorte humaine (1)	GPS Aorte porc (1)	GPS Tendon veau (1)	GPS Peau veau (1)	GPS Cartilage veau (2)	GPS Cornée veau (1)	Extr. urée- mercaptopéthanol de l'élastine purifiée au TCA 70 °(3)
ASP	9,8	9,5	10,8	7,3	9,1	10,2	8,1
GLU	11,3	10,7	10,8	7,9	10,2	11,3	9,7
THR	4,6	5,8	4,7	3,4	5,4	5,4	5,1
SER	3,7	6,0	4,2	6,2	5,6	5,9	8,0
PRO	5,9	5,6	5,6	6,9	4,3	5,6	4,0
GLY	12,4	9,5	8,7	15,8	12,5	10,5	18,0
ALA	8,5	8,7	7,3	8,9	10,1	7	8,0
VAL	7,9	8,0	9,4	7,9	6,4	8,6	4,5
CYS	1,4	2,8	1,3	2,7	0,8	1,5	+
MET	0,4	0,1	0,6	-	1,1	1,1	0,7
I-LEU	6,2	4,7	5,7	5,5	4,3	4,7	4,1
LEU	10,9	8,2	11	9,3	9,5	9,6	9,6
TYR	1,4	3	1,3	-	2,1	1,7	2,3
PHE	4,1	3,3	4,6	2,4	3	3,8	4,5
OH-LYS	-	+	-	-	5,6	1,1	-
LYS	4,2	6	5,6	4,8	6,8	4,4	6,2
HIS	2,6	2,3	2,7	6,9	3,3	1,6	2,2
ARG	4,7	4,8	5,9	4,1	5,2	6	5,0

(1) Purifiée par gel-filtration.

(2) Extrait urée de cartilage de l'oreille

(3) 1er extrait urée non purifié (résultats non publiés, obtenus avec A. KADAR, W. HORNEBECK et J.C. DEROUETTE (1973))

TABIEAU XIII

Composition osidique des glycoprotéines de structure de l'aorte et des glycopeptides obtenus par gelfiltration de l'hydrolysat pronase-collagénase de la média de l'aorte (voir Figure 25) {16, 17}.



Extrait	Hexoses %	Hexosamines %	Acide sialique %	R a p p o r t m o l a i r e								
				Gal	GlC	Man	Fuc	Sial	GlCN	GalN		
Urée 8M (selon méthode Fig.1)	1,8	1,9	0,03									
Glycopeptides pronase-collagénase de Fr. N° 4	27	22	-									
	20,2	6,4	1,58	1,0	0,6	0,4						
	4,3	4,2	0,74	1,0	0,6	0,9						
	2,0	2,0	-	1,0	1,0	0,5						
	1,6	0,5	-	1,0	0,6	0,4						
Sous-fractions électrophorétiques de la Fr N° 5 Fr. N° 1	1			1	1	1						
	2			1	0,6	1,1						
	3			1	0,1	0,8						
	4			1	0,07	1						
	5			1	0,2	1,7						
	6			1	0,05	1,2						
	7			1	0,6	1						

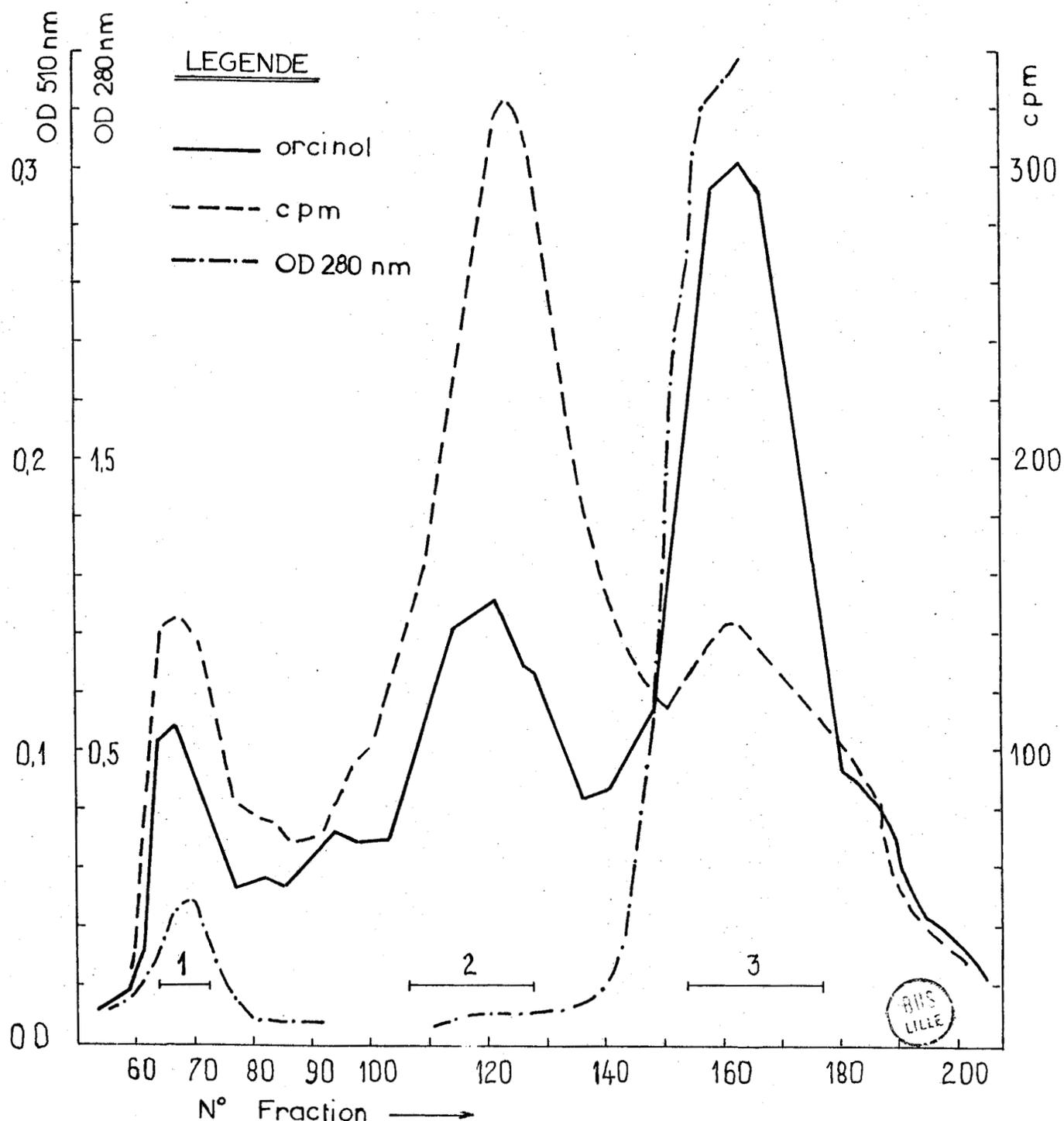
dont la composition en acides aminés et en glucides (voir Tableaux XII et XIII) diffère d'une façon radicale de celle du collagène, de l'élastine et des protéoglycannes.

La deuxième série d'études a été effectuée par digestion du stroma polymérique non fractionné (donc intact, natif) avec la pronase et la collagénase. Les glycopeptides ainsi obtenus sont alors fractionnés par gelfiltration sur Sephadex G-200. La Figure 25 montre le diagramme d'élution ainsi obtenu. L'éluat correspondant au premier pic contient essentiellement les glycosaminoglycannes composés d'hexosamines et d'acide glycuronique. Le deuxième pic représente l'élution de glycannes composés d'hexosamines, galactose, glucose, mannose, fucose et acide sialique. Au niveau du troisième pic, on élue essentiellement les glycoaminoacides du collagène (hydroxylysyl-galactose et glucosido-galactose).

Des expériences analogues ont été effectuées (en collaboration avec Mr et Mme MOCZAR) avec des aortes de lapin incubées au préalable pendant 4 heures à 37°C avec du 1-¹⁴C-galactose. Le profil d'élution radioactif montre une très forte incorporation du galactose au niveau du premier pic et une incorporation plus faible au niveau des deux autres pics. Dans l'hydrolysat du 2ème pic, on retrouve du galactose, et du glucose radioactifs. Ceci montre qu'en 4 heures, les cellules musculaires lisses de l'aorte ont incorporé le 1-¹⁴C-galactose dans des précurseurs nucléotides-sucres et ensuite dans les trois types de glycopeptides

Figure 25

Profil d'élution sur Sephadex G-50 des glycopeptides de la media de l'aorte de porc préalablement incubée avec du 1-galactose- ^{14}C pendant 4 heures, après digestion par la pronase et la collagénase. Elution avec acide acétique 0,1 M, fractions de 5 ml (M. MOCZAR, E. MOCZAR, L. ROBERT, résultats non publiés).



de la média. La forte radioactivité des glycopeptides dans le 2ème pic montre que ces substances sont rapidement synthétisées au niveau de la média. L'activité spécifique très différente des glycanes récupérés à partir du 2ème et 3ème pics (voir Figure 25) suggère une vitesse de synthèse différente pour ces deux types de glycoprotéines. Il paraît probable que les glycopeptides du 2ème pic correspondent aux glycoprotéines de structure et que les glyco-aminoacides du 3ème pic proviennent des fibres de collagène.

Ces expériences rendent donc très probable la présence de glycoprotéines en tant que constituants moléculaires autonomes dans la matrice intercellulaire de l'aorte. Des glycoprotéines d'une composition similaire peuvent être extraites à partir de fibres élastiques purifiées {39}. BARNES et PARTRIDGE (72), DAVRIL et MOSCHETTO (73), ROSS et BORNSTEIN (74) et d'autres auteurs encore (75) ont isolé des glycoprotéines identiques ou similaires.

La conclusion essentielle de la thèse que nous défendons ici, est l'apparente identité des glycoprotéines de structure, extraites à partir de la média de l'aorte, par extraction directe du tissu (Figure 1) et des glycoprotéines obtenues à partir de préparations d'élastine purifiée (Figure 4). Cette similitude, voire identité, repose sur les arguments suivants : a) propriétés de solubilité similaires ; b) composition en acides aminés similaire , sinon identique ; c) composition en carbohydrates similaire ; d) existence de réaction immunologique croisée entre ces deux types de préparations glycoprotidiques {28} et e) morphologie moléculaire

similaire ou identique au microscope électronique. Ce dernier argument mérite d'être développé plus en détail.

4°/ Morphologie des glycoprotéines extraites de l'aorte (glycoprotéines de structure) et de l'élastine purifiée.

Des préparations de glycoprotéines de structure, obtenues selon la méthode représentée sur la Figure 1 (extrait urée-mercaptoéthanol) ont été partiellement purifiées par passage sur colonne de Sephadex G-200 et la fraction exclue a été dialysée et lyophilisée et incluse dans de l'époue.

Des extraits urée-mercaptoéthanol ont été préparés à partir de préparations purifiées d'élastine, selon le protocole représenté sur la Figure 4. Ces extraits ont été passés sur colonne de Sephadex G-200, dialysés, lyophilisés et inclus dans l'époue {39}.

Les images de ces préparations ont été comparées aux images obtenues pour des préparations d'élastine purifiée par différentes méthodes et aussi à celles du stroma polymérique de l'aorte. Nous présentons ci-dessus quelques images obtenues au cours de ces études effectuées en collaboration avec le Prof.A. KADAR de l'Université de Budapest {39}. La Figure 26/A montre une préparation de stroma polymérique d'aorte de porc : la media a été extraite avec du NaCl 1 M pour éliminer les protéines solubles. Le résidu insoluble

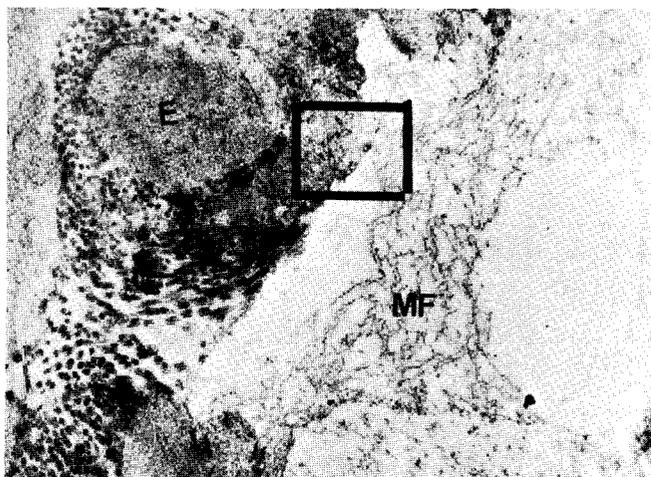
Figure 26

(A) Stroma polymérique d'aorte de porc contenant des fibres de collagène (C), d'élastine (E) et des microfibrilles (MF) {39, 44}.

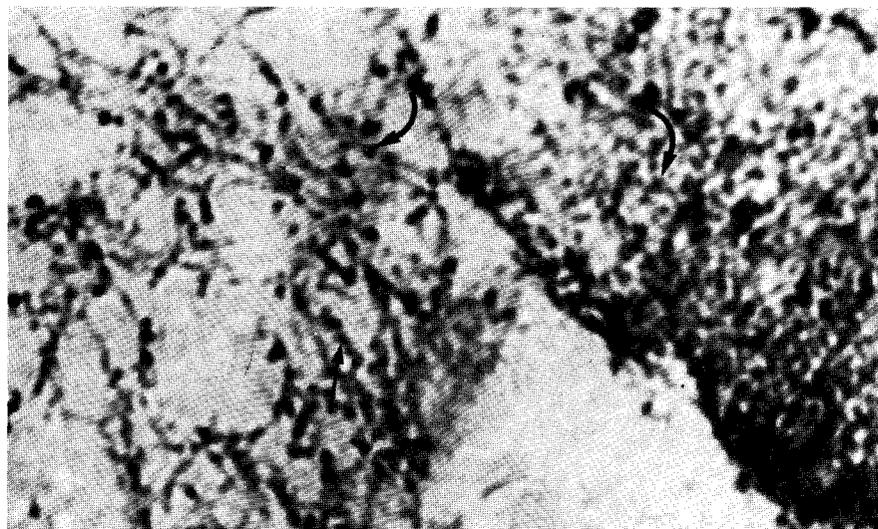
Acétate d'uranyl-Pb, x 27000

(B) Une partie de la précédente figure agrandie à x 350.000 montrant les microfibrilles et le bord d'une lame élastique. Les chapelets microfibrillaire ont un diamètre de 120 \AA (flèche droite). Présence d'unités globulaires plus grandes, $d : 180 \text{ \AA}$ (flèche courbée).

A



B



INS
LILLE

contient des fibres de collagène et d'élastine, et aussi des structures microfibrillaires qui sont montrées dans l'agrandissement d'une petite parcelle de la photo (Figure 26/B).

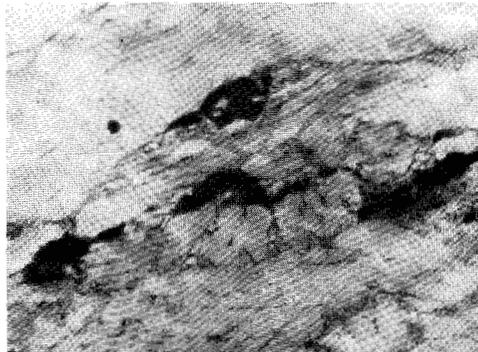
La Figure 27/A représente une préparation d'élastine obtenue à partir du ligament large du veau, préparée par autoclavage selon PARTRIDGE. On note les plages translucides aux électrons, cernées d'un liseré microfibrillaire. La Figure 27/B montre une préparation d'élastine du même ligament large obtenu par notre méthode au TCA à 70 % (voir Tableau I). On note une densité microfibrillaire beaucoup plus grande que dans la préparation autoclavée. Quand on soumet cette préparation à une extraction par l'urée 8 M-mercaptoéthanol 0,1 M, on la "blanchit" (voir Figure 27/C). La densité microfibrillaire diminue sensiblement à la suite de ce traitement.

Quand on analyse les préparations obtenues à partir de ces extraits urée, on note la présence de structure microfibrillaires (voir Figure 28). A faible grossissement, les microfibrilles imitent les contours des lames élastiques (Figure 28/A). A plus fort grossissement, on observe une structure élémentaire globulaire, formant des chapelets. Le diamètre de ces chapelets est de l'ordre de 120 \AA au niveau des plus forts diamètres et de 80 \AA au niveau des étranglements entre les unités globulaires. La morphologie de ces microfibrilles reconstituées n'est pas identique à celle des microfibrilles observées dans l'élastine native, mais elle est

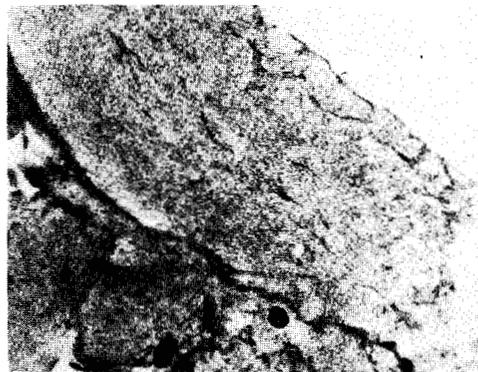
Figure 27

Microscopie électronique de différentes préparations d'élastine
(en collaboration avec le Prof. A. KADAR {39, 44}).

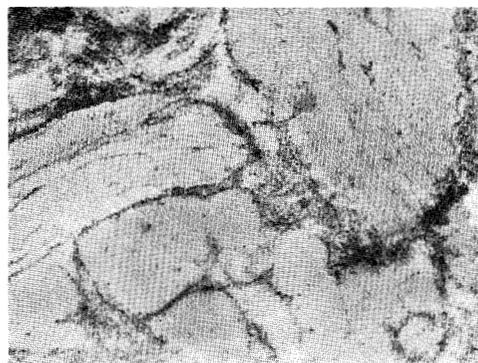
- (a) Préparation obtenue par autoclavage, LLB. Acétate d'uranyl-Pb-osmium, x 21.700.
- (b) Préparation obtenue par extraction au TCA à 70° (Figure 2) du LLB, même traitement, x 31.700
- (c) Même préparation que (b), mais après extraction à l'urée 8 M-mercaptoéthanol 0,1 M. Même traitement + Rouge de ruthenium, x 23.700.



A



B



C



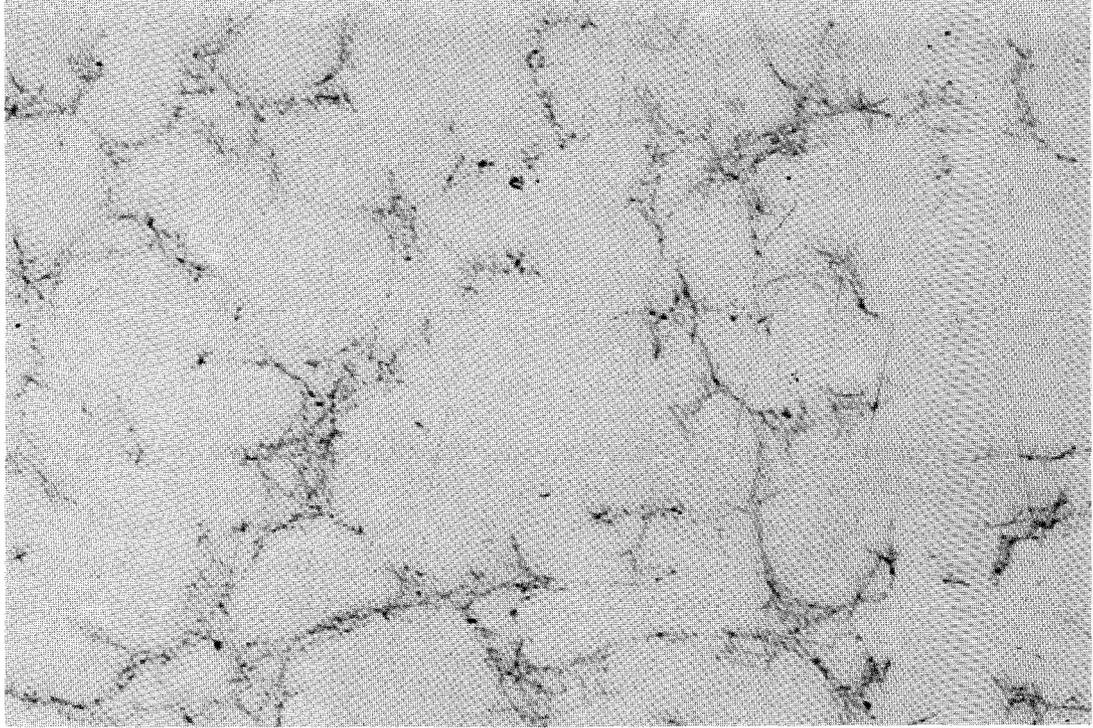
Figure 28

Glycoprotéines de structure purifiées à partir de l'aorte de porc (voir Figure 1). Acétate d'uranyl-Pb-osmium {39, 44}.

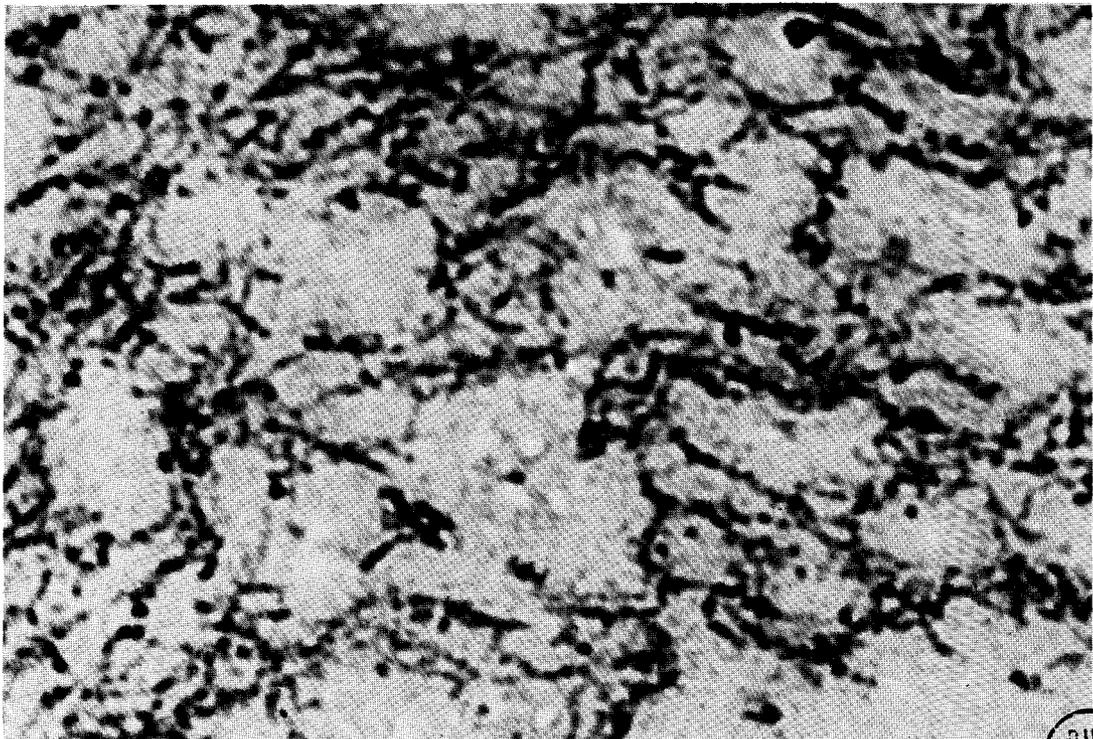
A x 30.000

B x 350.000

A



B



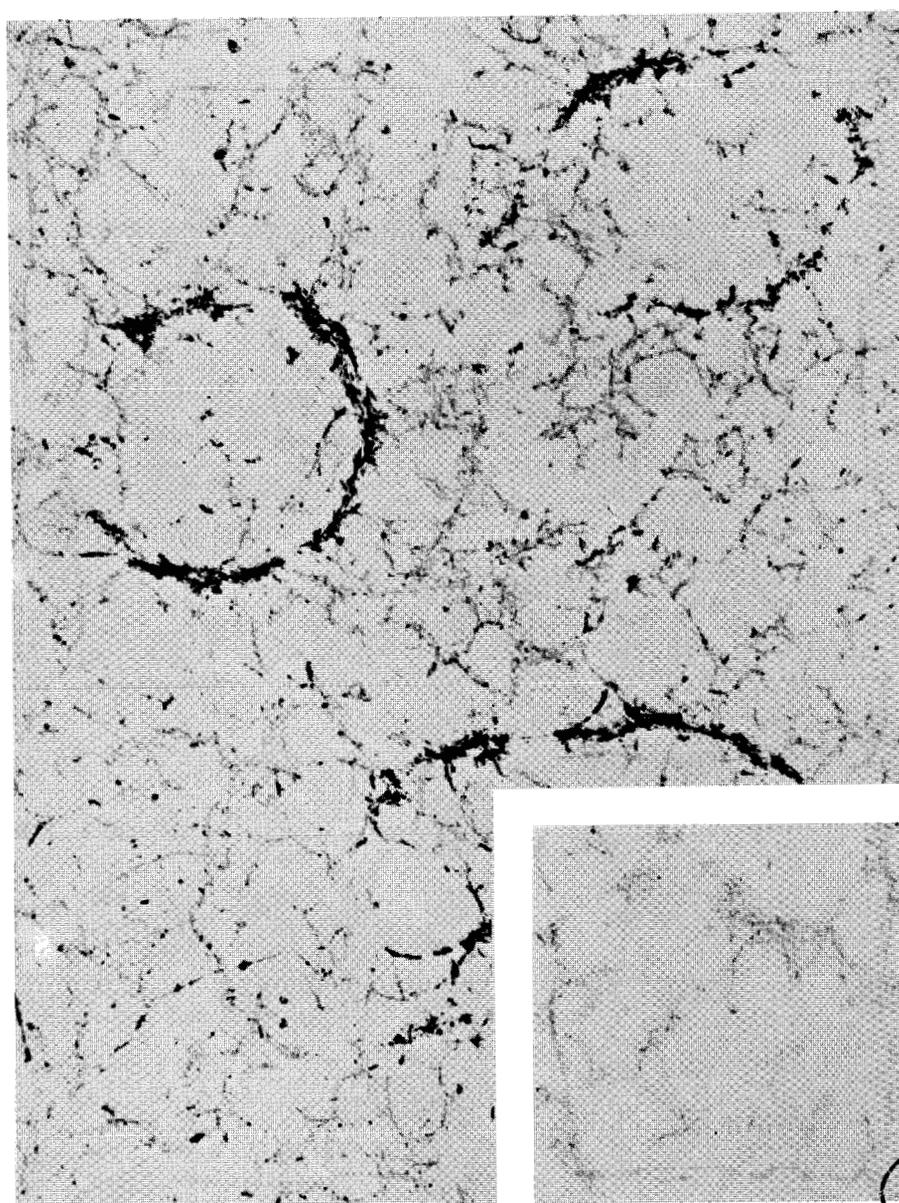
BUS
LILLE

Figure 29

Microscopie électronique de l'extrait urée-mercaptoéthanol
de l'élastine purifiée par le TCA à 70 % (voir Figures 1 et 4)
{39, 44}.

Rouge de ruthenium x 35.000

Cartouche : même préparation contrastée à l'acétate d'Uranyl-Pb
x 44.500



très similaire. Pour s'en rendre compte, il suffit de comparer les Figures 26, représentant les microfibrilles dans le stroma polymérique natif, et la Figure 28 représentant les microfibrilles dans l'extrait urée purifié. La ressemblance est frappante et n'est probablement pas fortuite.

La Figure 29 montre la morphologie des glycoprotéines de structure de l'élastine, préparées selon la méthode représentée sur la Figure 4 (extraits urée de l'élastine purifiée). Ces images ressemblent également de très près à celles données pour les microfibrilles du stroma polymérique natif.

D'après ces études morphologiques, il paraît donc possible de conclure à une analogie morphologique entre ces trois types de structures microfibrillaires. En effet, il paraît probable qu'il s'agisse des mêmes substances ou, du moins, de substances très similaires.

5°/ Conclusions

L'étude des glycoprotéines du tissu élastique suggère les conclusions suivantes : (a) des glycoprotéines de structure existent en tant que constituants moléculaires autonomes au niveau de la matrice intercellulaire de l'aorte ; (b) la composition de ces glycoprotéines est similaire (sinon identique)

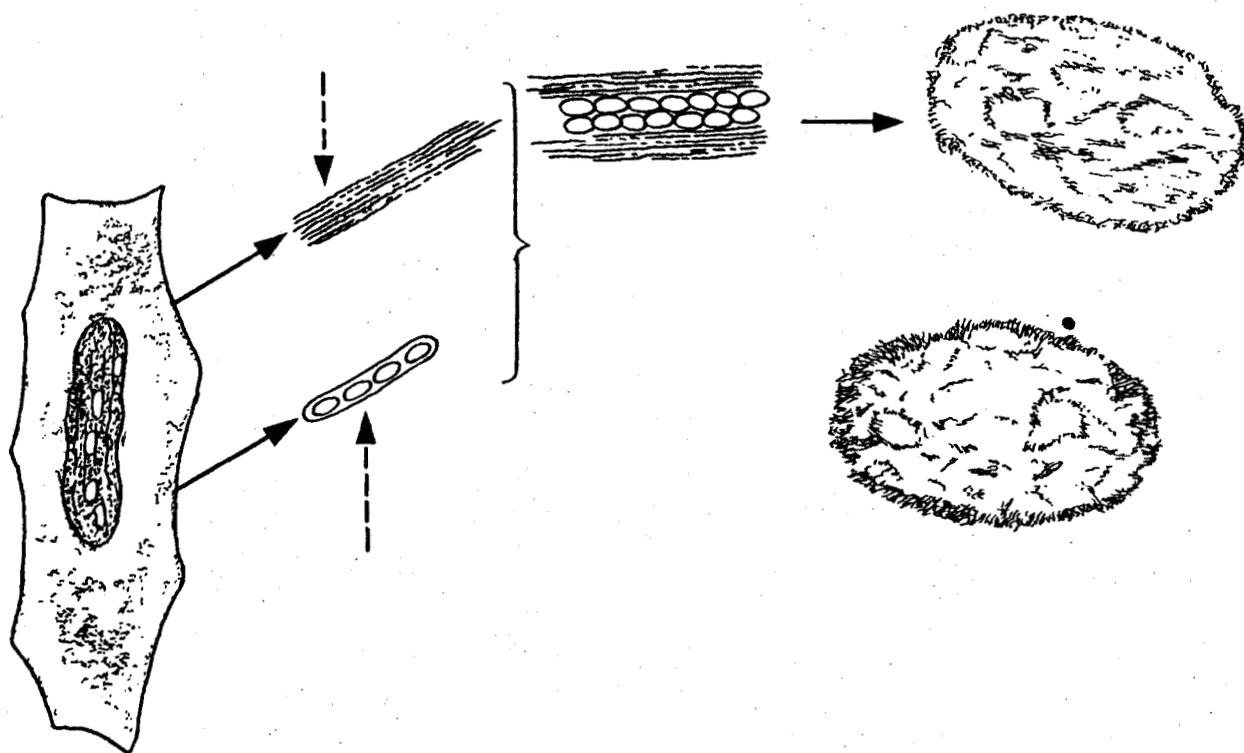
à celle des glycoprotéines qui peuvent être extraites à partir de fibres élastiques purifiées par différentes méthodes ; (c) la morphologie moléculaire de ces deux types de glycoprotéines est très similaire, sinon identique, et paraît correspondre à celle des "microfibrilles" décrites par plusieurs auteurs dans des tissus élastiques intacts.

Il reste néanmoins possible que plusieurs types de sous-unités, de composition similaire mais non identique, se combinent pour former des agrégats microfibrillaires de taille et de structure différentes. Ceci est rendu probable par les différences considérables entre le poids moléculaire rapporté par plusieurs auteurs pour ces glycoprotéines plus ou moins purifiées (73 , 74). Ces poids moléculaires s'échelonnent en effet entre 12.500 et 270.000. Etant donné la grande difficulté de dissocier entièrement les ponts disulfures et rompre les fortes interactions hydrophobes unifiant ces molécules, nous ne pouvons accorder à ces hauts poids moléculaires une signification définitive. D'autres travaux seront nécessaires pour préciser la nature exacte des sous-unités des microfibrilles et pour comprendre la nature exacte de leur capacité d'association entre elles et avec les molécules de tropoélastine.

Néanmoins, il paraît plausible de proposer le schéma suivant pour l'interaction entre microfibrilles glycoprotidiques et tropoélastine au cours de la formation des fibres élastiques (voir

Figure 30

Représentation schématique de l'élastogénèse. La cellule musculaire lisse synthétise les glycoprotéines de structure-microfibrillaires (en haut) et les molécules de tropo- (ou pro-) élastine (en bas). La fibre élastique jeune (au milieu) est riche en microfibrilles. La lame élastique mature présente des plages de tropoélastine pontée bordées et traversées par des microfibrilles (à droite).



(Figure 30) : les cellules musculaires lisses déposeraient d'abord des microfibrilles qui, grâce à leur charge négative, fixeraient les molécules de tropoélastine (positivement chargées à cause de leur richesse en lysine) dans une position stérique apte à interagir avec la molécule de tropoélastine voisine. Les liaisons intercaténares (desmosine) formées à la suite de l'action d'une lysine-oxydase spécifique se formerait d'une façon stériquement orientée par la trame microfibrillaire. Conformément à cette hypothèse, les fibres élastiques jeunes sont riches en microfibrilles. Avec la maturation, la densité microfibrillaire baisse au profit de l'élastine réticulée. Au fur et à mesure que l'élastine se dégrade en fonction de l'âge, processus accéléré par l'artériosclérose, la densité microfibrillaire augmenterait à nouveau, probablement à la suite d'une tentative de synthèse réparatrice effectuée par la cellule musculaire lisse. Ces propositions sont corroborées par les résultats rapportés par l'école du Prof. BISERTE (MOSCHETTO *et al* (71, 73)) et aussi par les travaux de ROSS *et al* et HAUST *et al* (65, 67). Cette hypothèse paraît donc compatible avec les données expérimentales actuellement disponibles.

D - MODIFICATION DE L'ELASTINE AU COURS DU VIEILLISSEMENT

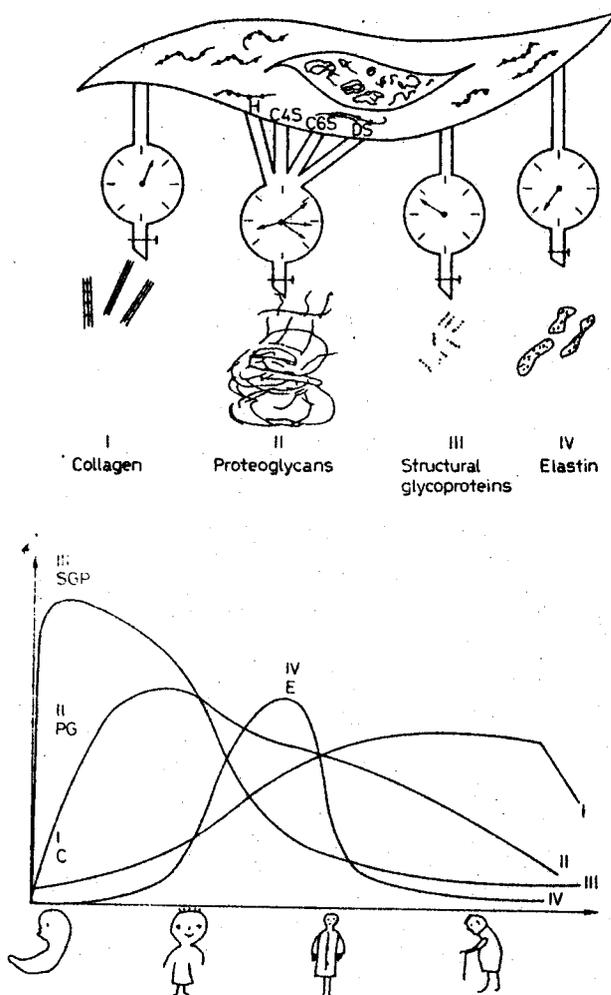
ET DE L'ATHERO- ARTERIOSCLEROSE

1°/ Introduction

Les études de la composition macromoléculaire de la matrice intercellulaire des tissus, en fonction de l'âge, a révélé des modifications qualitatives et quantitatives importantes {76}. Ces résultats ont conduit au concept du "programme" de biosynthèse des macromolécules de la matrice intercellulaire. Ce "programme" peut être symbolisé par des chronomètres qui règlent le débit des 4 types de macromolécules (collagène, élastine, protéoglycannes et glycoprotéines de structure) en fonction de l'âge (Figure 31/A). Ce concept, qui repose sur un grand nombre de faits expérimentaux {76}, permet de faire un certain nombre de prédictions qui ont pu être vérifiées expérimentalement. Ainsi, par exemple, la vitesse relative de biosynthèse des macromolécules doit changer avec l'âge. Ceci est représenté sur la Figure 31/B et a été vérifié pour plusieurs tissus différenciés {76}. Il découle aussi de cette théorie que des états pathologiques pourraient modifier la vitesse de synthèse de certaines macromolécules. Nous avons effectué des expériences pour vérifier ces hypothèses en vue

Figure 31

Représentation schématique du principe de la régulation de la biosynthèse des quatre familles de M.M.I. au cours de la différenciation, maturation et vieillissement des cellules mesenchymateuses [77]. Une des conséquences de ce "déroulement du programme de synthèse" est la variation continue de la composition en M.M.I. des tissus.



d'obtenir des renseignements sur la nature des régulations qui déterminent le déroulement du "programme de biosynthèse" et aussi sur sa modification à l'état pathologique. Nos études ont porté sur l'aorte de lapin et sur l'aorte humaine, normale ou athéromateuse. Dans une première série d'expériences, nous avons étudié la biosynthèse des macromolécules de l'aorte en fonction de l'âge de l'animal.

2°/ Biosynthèse de l'élastine en fonction de l'âge chez le lapin.

Etude en culture d'organe [62].

Des aortes (intima + media), fraîchement prélevées chez des lapins d'âges différents, (nouveau-né, jeune lapin de 400 g et lapin adulte de 2,5 à 3,5 kg) de la souche consanguine "Alfort" du Prof. THERET (Ecole Vétérinaire, Maison Alfort), ont été mises en culture dans le milieu MEM de Eagle (5 ml) dans des flacons Petri-Greiner de 5 cm de diamètre, en présence de serum de veau foetal (10 %), de streptomycine (10 µg/ml) et de pénicilline (100 U/ml) et de mycostatine (100 U/ml) en atmosphère O₂ (95 %) et CO₂ (5 %). On change le milieu tous les 3 jours.

Pour étudier la vitesse de biosynthèse des macromolécules de l'aorte, on ajoute au milieu 20 µCi de glucose-³H (Radiochem. Center, Amersham, Angleterre, 1,1 Ci/mM).

Après 3 et 6 jours d'incubation avec l'isotope, on lave les fragments et on les soumet à l'extraction séquentielle des macromolécules par une méthode analogue à celle représentée sur la Figure 1, utilisant la collagénase à la place du TCA et dans l'ordre suivant : 1) tampon CaCl_2 1M-tris-citrate ; 2) urée 8 M-mercaptoéthanol 0,1 M ; 3) collagénase et 4) élastase. Cette dernière fraction contient l'élastine polymérique.

Les études histologiques et électro-physiologiques ont confirmé la bonne conservation de la structure de l'aorte pendant plus d'une semaine en culture d'organe (62). Les fragments d'aorte préservent leur capacité de réagir par contraction aux stimuli électriques et pharmacologiques (76). La Figure 32 montre l'incorporation de deux traceurs dans les extraits d'aortes en fonction de l'âge de l'animal. Les résultats sont exprimés en dpm/mg DNA afin de refléter, dans la mesure du possible, l'activité biosynthétique par cellule

On peut noter une très forte décroissance de l'incorporation des deux précurseurs avec l'âge de l'animal. Cette diminution concerne l'ensemble des macromolécules présentes dans tous les extraits. La seule fraction qui semble, dans une certaine mesure, échapper à cette règle est l'extrait calcique avec la lysine comme traceur, (faible augmentation de sa radioactivité dans l'aorte adulte). L'extrait urée-mercaptoéthanol représente la plus grande partie de la radioactivité à tous les âges. L'extrait élastase représente

Figure 32

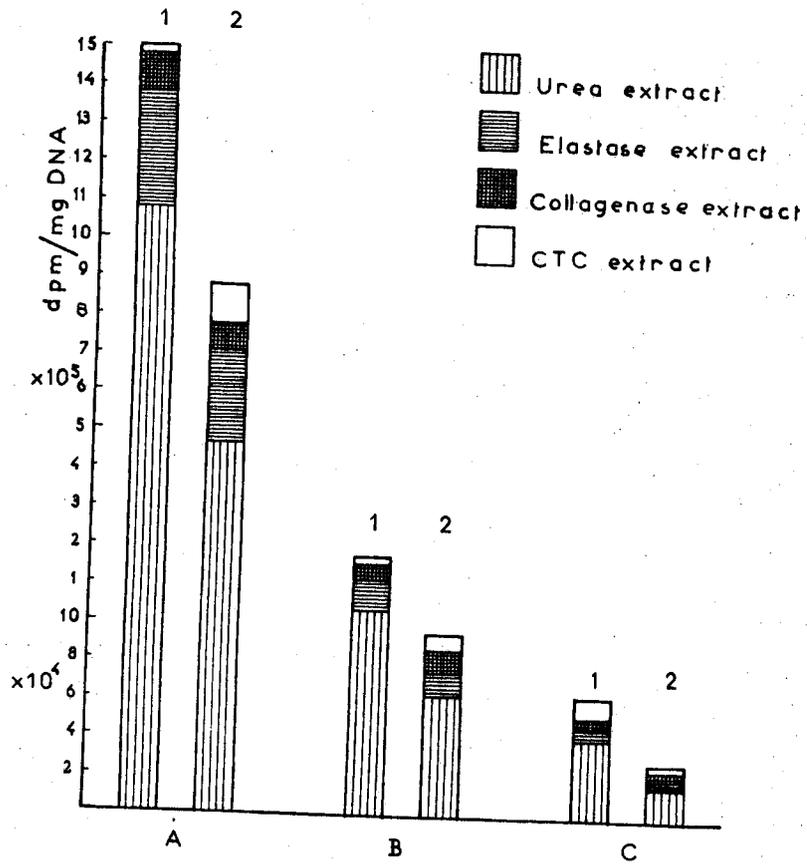
Incorporation de la U-lysine- ^{14}C (1) et de la U-glucosamine- ^3H (2) dans les aortes de lapin nouveau-né (A), jeune de 400 g (B) et adulte, 2,5-3,5 kg (C), en culture d'organe pendant 3 jours. La radioactivité des extraits est donnée en dpm/mg DNA.

Extrait calcique, contenant les macromolécules extractibles au CaCl_2 1 M-tris-citrate à pH 7,5.

Extrait urée 6 M-mercaptoéthanol 0,1 M, contenant les glycoprotéines de structure, des protéoglycannes et une partie (peu pontée) du collagène et de l'élastine.

Extrait collagénase, contenant le collagène polymérique et une partie de l'élastine (oligomérique).

Extrait élastase, contenant l'élastine réticulée.



un pourcentage relativement faible de la radioactivité totale chez le jeune animal comme chez l'adulte. L'explication probable en est la forte proportion d'élastine peu pontée (oligomérique, non encore suffisamment pontée) chez le jeune animal. Une fraction importante de la tropoélastine oligomérique doit se retrouver dans l'extrait urée et collagénase. L'existence de tels agrégats de tropoélastine oligomérique est rendue probable par la mise en évidence de desmosine radioactive dans l'extrait collagénase (voir Tableau XIV) et aussi par la démonstration d'élastine "faiblement réticulée" à côté de l'élastine "fortement réticulée" dans l'aorte humaine par MOSCHETTO *et al* (71). Chez l'animal âgé, le ralentissement de la biosynthèse et/ou du pontage de l'élastine explique la très faible incorporation de la lysine dans le résidu insoluble (extrait élastase). La présence de glucosamine-³H dans cette fraction peut être attribuée aux composantes microfibrillaires-glycoprotidiques.

Ce ralentissement de la vitesse d'incorporation des deux traceurs peut être interprété comme la conséquence du ralentissement de la biosynthèse des macromolécules de l'aorte avec l'âge, *in vivo*. Que cette interprétation soit exacte ressort aussi des données du Tableau XIV qui donne l'incorporation de la lysine-¹⁴C dans la desmosine, isolée à partir des explants, après 3 et 6 jours de culture. La desmosine a été isolée à partir des hydrolysats HCl 6 N des extraits élastase et collagénase par électrophorèse sous haut voltage {34}.

TABLEAU XIV

Incorporation de la lysine-¹⁴C dans la desmosine dans des aortes de lapin incubées en culture d'organe pendant 3 jours et 6 jours {62}. Radioactivité exprimée en dpm/ μ M.

	3 jours			6 jours		
	nouveau-né	jeune	adulte	nouveau-né	jeune	adulte
Lysine		24.000	5.600		10.300	6.200
Desmosine (extrait élastase)		2.100	0		5.900	2.000
Desmosine (extrait collagénase)	54.300	12.500	-	72.700	25.800	-



On peut noter sur ce tableau : (a) que la lysine- ^{14}C s'est bien incorporée dans la desmosine (et l'isodesmosine migrant avec la desmosine) ; (b) que la desmosine radioactive a pu être isolée à partir de l'extrait collagénase aussi bien qu'à partir de l'extrait élastase et (c) que la radioactivité spécifique de la desmosine diminue avec l'âge.

Chez le nouveau-né, la desmosine radioactive n'a pu être isolée qu'à partir de l'extrait collagénase. Sa plus forte radioactivité spécifique, par rapport à celle de la desmosine isolée à partir de l'extrait élastase chez le jeune lapin, confirme l'hypothèse selon laquelle l'extrait collagénase contiendrait des molécules de tropoélastine fraîchement pontées mais non encore suffisamment réticulées pour résister à l'action dissociative des solvants et enzymes utilisés, tandis que l'extrait élastase contiendrait les fibres élastiques suffisamment pontées pour leur conférer l'insolubilité dans les solvants utilisés.

Après 3 jours de culture, on peut déceler la desmosine radioactive dans les extraits des aortes de lapin nouveau-né et jeune. Chez l'adulte, ce n'est qu'après 6 jours de culture que l'on a pu déceler de la desmosine radioactive.

On peut conclure de cette expérience à l'existence d'une régulation qualitative et quantitative de la biosynthèse des macromolécules de l'aorte déterminant la qualité et la quantité des macromolécules

synthétisées avec l'âge. Cette régulation se traduit par une proportion bien définie dans la synthèse des différentes macromolécules. D'autre part, ce "programme" prévoit une baisse régulière de la synthèse des macromolécules avec l'âge. Cette baisse se traduit par un ralentissement de l'incorporation des deux traceurs utilisés et aussi par une nette diminution de la synthèse d'élastine réticulée.

Comme les expériences ont été effectuées en culture d'organe, des influences nerveuses ou hormonales n'ont pas pu modifier l'activité biosynthétique des cellules. Il faut donc supposer que la baisse de la vitesse de synthèse des macromolécules de l'aorte est déterminée par un "système" de régulation présent dans l'aorte elle-même. Une expérience préliminaire a montré cependant que tout ne dépendait pas des cellules et que l'interaction cellule-stroma devait avoir une grande importance dans le phénomène observé. Quand on effectue des expériences analogues à celle qui vient d'être décrite, mais avec des cultures cellulaires à la place des cultures d'organe, on ne constate plus le ralentissement considérable de l'activité biosynthétique globale par cellule.

Des cultures de cellules musculaires lisses ont été obtenues par trypsinisation des explants d'aorte de lapin nouveau-né et de lapin adulte. Ces cellules, qui avaient toutes les caractéristiques des cellules musculaires lisses, ont été incubées à la 4ème sous-culture (4ème passage) avec des traceurs radioactifs (proline-³H

TABLEAU XV

Incorporation de la proline-³H et de la glucosamine-¹⁴C dans des macromolécules excrétées dans le milieu et dans des macromolécules adhérent aux cellules (trypsinat) par des cellules musculaires lisses (4ème passage) obtenues à partir d'aorte de lapin nouveau-né et de lapin adulte [62]. Résultats exprimés en dpm/mg prot. /10⁶ cellules.

Milieu	Cellules du nouveau-né		Cellules de l'adulte	
	¹⁴ C-GlcN	³ H-pro	¹⁴ C-GlcN	³ H-pro
Surnageant de dialyse	10.800	6.100	23.500	13.000
Précipité de dialyse	8.800	3.700	27.600	9.500
Trypsinat	54.400	40.000	44.200	64.500

et glucosamine-¹⁴C) pendant 24 heures. Le Tableau XV montre que la radioactivité incorporée exprimée par mg de protéines et par 10^6 cellules, non seulement n'est pas plus faible pour les cellules obtenues à partir de l'aorte de lapin adulte, mais est plus forte que celle observée pour les cellules dérivées de l'aorte de lapin jeune.

Il semble donc qu'en absence de stroma fibreux, et libérées de leur environnement naturel, les cellules musculaires lisses ne soient plus soumises à cette stricte régulation quantitative de la synthèse macromoléculaire.

Le résultat est le même, que l'on considère les macromolécules "exportées" dans le milieu ou les macromolécules adhérant à la couche cellulaire (trypsinat). Il semble donc que la décroissance de l'activité biosynthétique de l'aorte avec l'âge soit la conséquence de l'interaction cellule-matrice et non seulement d'un programme génétique fonctionnant indépendamment de l'environnement cellulaire.

L'existence d'un "programme" de synthèse intrinsèque, codé probablement dans le génome, a pu être néanmoins confirmée par l'analyse des macromolécules présentes dans le milieu et dans le trypsinat {62}. Le milieu de culture de cellules musculaires lisses du lapin nouveau-né contient de fortes quantités d'un glycosaminoglycannes sensible à l'hyaluronidase et peu de glycannes de taille moyenne, dérivés des glycoprotéines. Le milieu de culture des

cellules provenant d'aorte de lapin adulte contient surtout de tels glycanes et peu de glycosaminoglycanes à haut poids moléculaire (exclus du Sephadex G-200). Des différences ont pu être décelées aussi au niveau des macromolécules récupérées dans le trypsinat. Le profil d'élution radioactif obtenu à partir des cellules jeunes, sur Sephadex G-200) montre la quasi absence de glycosaminoglycanes marqués et présente surtout un pic radioactif au niveau des glycanes de faible poids moléculaire.

Le profil d'élution du trypsinat des cellules âgées montre un pic important au niveau des GAG à haut poids moléculaire et aussi un pic élargi et important au niveau des glycopeptides à faible taille. Ces résultats sont en accord avec les observations de MACIERA-COELHO (77) et des STEIN (78) concernant l'augmentation de la taille des cellules avec l'âge *in vitro* et *in vivo* {78}.

Ces résultats suggèrent l'existence d'un "programme" de synthèse des macromolécules "exportées" et aussi des macromolécules du "cell coat" (ou adhérant fortement aux cellules). Ce "programme" se manifeste par une modification qualitative des macromolécules synthétisées et paraît être indépendant de la régulation quantitative de la synthèse des macromolécules de la matrice intercellulaire et qui s'est manifestée en culture d'organe par une baisse de l'incorporation en fonction de l'âge.

L'intérêt de cette démonstration est double : elle révèle la nature complexe du "programme" de synthèse en fonction de l'âge, même au niveau d'un organe isolé, et suggère l'existence d'une régulation dépendante de l'interaction stroma-cellule et d'une certaine régulation intrinsèque aux cellules elles-mêmes. Elle montre, d'autre part, que les cellules musculaires lisses isolées, en culture, ne reflètent pas forcément l'état d'activité biosynthétique de l'aorte d'où elles sont dérivées. Il convient donc d'utiliser les cultures d'organe aussi bien que les cultures cellulaires pour des études de biochimie pathologique. Cette restriction de l'usage exclusif des cultures cellulaires est d'autant plus nette que les cellules que nous avons utilisées pour nos expériences avaient le même âge en culture (4^{ème} passage ou sous-culture) et ne sont donc pas influencées par le phénomène de vieillissement des cellules *in vitro* (77)(78).

Il n'est pas impensable, par contre, que nos résultats aient été influencés par une sélection imposée aux cellules de l'aorte par les conditions de culture. Nos expériences, actuellement en cours, devront confirmer ou infirmer cette hypothèse. La vérification éventuelle ne pourrait que renforcer les restrictions ci-dessus mentionnées à l'usage exclusif des cultures cellulaires en pathologie.

3°/ Modifications de l'élastine au cours de l'athéro- artériosclérose

Introduction

Les expériences ci-dessus décrites rendent probable l'existence d'un programme de synthèse des macromolécules de l'aorte en fonction de l'âge. Or, nous avons pu montrer qu'au cours de l'artériosclérose la composition de la paroi artérielle est modifiée {40, 44, 46}. L'élastine elle-même paraît subir des modifications qualitatives et quantitatives, à la suite de la fixation du calcium(79,80), de lipides(81,82); son degré de pontage diminue (71). Les modifications constatées par nous-mêmes et par d'autres auteurs (83, 84) peuvent être mises sur le compte de trois types de phénomènes au moins : (a) une accélération du catabolisme de certaines macromolécules ; (b) une modification du programme de biosynthèse dû aux macromolécules et (c) une interaction entre les éléments (protéines, lipoprotéines, plaquettes) véhiculés par le sang et les cellules et macromolécules de l'aorte. Les trois types de phénomènes existent et sont importants pour la compréhension du mécanisme des maladies artérielles.

- a) Accélération du catabolisme de l'élastine avec l'âge et au cours de la maladie artérielle {40, 43, 45, 46, 50, 55, 57, 61}

Nous avons pu démontrer avec Barbara ROBERT et W. HORNEBECK

l'existence d'une activité élastinolytique importante dans des extraits d'aorte de plusieurs espèces. L'activité de cette élastase artérielle se manifeste vis-à-vis de la κ -élastine, les substrats synthétiques de l'élastase pancréatique et aussi vis-à-vis de l'élastine polymérique. Cette dernière action est beaucoup plus lente que pour l'élastase pancréatique avec laquelle l'élastase de l'aorte donne pourtant une réaction d'identité partielle par immunodiffusion {55}.

Quand on détermine cette activité, dans des extraits d'aorte humaines partiellement purifiées (extrait acétate précipité avec le sulfate d'ammonium à 60 % de saturation), on constate qu'elle augmente régulièrement avec l'âge (Figure 22/A) et avec le degré d'athéromatose (Figure 22/B). Ces deux facteurs paraissent influencer l'activité de l'élastase de l'aorte d'une façon indépendante et additive {61}. L'étude détaillée de cette enzyme et de son mode d'action fait l'objet de la thèse de Doctorat d'Etat de W. HORNEBECK. {70}.

Ces expériences permettent donc d'affirmer que la fragmentation et la lyse progressive des lames élastiques, observée par des anatomo-pathologistes depuis VIRCHOW, peut être attribuée en partie au moins à l'activité croissante d'une élastase artérielle. Il paraît probable que l'élastase des plaquettes sanguines que nous avons mise en évidence, isolée et caractérisée avec B. ROBERT et

Y. LEGRAND {13, 24, 26, 30, 35, 51} y contribue dans une certaine mesure, surtout au niveau de l'intima et de la lame élastique limitante interne. La démonstration récente de l'adhésion des plaquettes sur l'élastine {56} rend très probable cette hypothèse. La thèse d'Etat de Y. LEGRAND contient toutes les informations à cet égard {69}.

b) Modification du "programme" de synthèse des macromolécules à la suite d'interaction entre les cellules musculaires lisses et les lipoprotéines sériques {63}

Il paraît bien établi aujourd'hui que les lipides, voire les lipoprotéines, jouent un rôle important dans le processus athéromateux (81,82,83,84). Depuis quelques années, on commence à entrevoir le mécanisme d'action des lipoprotéines au niveau de la paroi artérielle. On a pu mettre en évidence, en particulier, une stimulation de la prolifération cellulaire en culture (85) et une pénétration (par endocytose) préférentielle des lipoprotéines légères (LDL, VLDL) dans les cellules musculaires lisses en culture (86).

Nous avons voulu vérifier si cette interaction entre cellules musculaires lisses et lipoprotéines était capable de modifier le déroulement du programme de biosynthèse des macromolécules de l'aorte. A cet effet, des aortes de lapin adulte (2,5-3 kg de la souche "Alfort") ont été mises en culture d'organe comme décrit pour les étudier en fonction de l'âge. Chaque aorte a été coupée

longitudinalement en deux et un fragment a été incubé en présence de 10 % de serum humain normal et l'autre fragment en présence de 10 % de serum humain hyperlipémique (types IV et V selon FREDERICKSON). Le traceur utilisé a été la U-Lysine-¹⁴C. Après 3 jours de culture, les aortes sont soumises à une extraction séquentielle, légèrement modifiée par rapport à celle représentée sur la Figure 1. Le premier extrait est obtenu avec de l'ATP 0,5 mM dithiothreitol (0,5 mM) dans du CaCl₂ 0,2 M. Ce tampon permet d'extraire certaines protéines contractiles intracellulaires telles que l'actine (extrait DTT-ATP). La deuxième extraction est effectuée avec du NaCl 1 M, suivi de MgCl₂ 2 M, par l'urée 8 M-mercaptoéthanol 0,1 M. Le résidu insoluble est hydrolysé par la collagénase puis par le KOH 1 M dans l'éthanol aqueux à 80 %. Le Tableau XVI montre qu'en présence de serums hyperlipémiques, l'incorporation a considérablement diminué dans tous les extraits, sauf dans l'extrait obtenu avec la collagénase.

Ces résultats suggèrent la présence d'un facteur (pas forcément de nature lipoprotidique) présent dans les serums hyperlipémiques utilisés et capable d'inhiber l'incorporation de la U-lysine-¹⁴C dans la quasi totalité des macromolécules de l'aorte avec l'exception notable du collagène polymérique.

Ces études, actuellement poursuivies en collaboration avec Mme MOCZAR et B. PHAN-DINH-TUY, devront permettre de confirmer s'il existe bien un échappement sélectif de la biosynthèse du collagène

TABLEAU XVI

Effet du serum humain hyperlipémique (du type IV et V selon FREDERICKSON) sur l'incorporation de la lysine- ^{14}C dans les macromolécules de l'aorte du lapin adulte après 3 jours de culture. Résultats (moyenne \pm SEM) donnés en dpm/mg protéines pour les extraits et en dpm/g tissu frais pour la radioactivité totale. Pour le schéma d'extraction, voir le texte {63}.

Extraits

Sérum (°)	Radioactivité totale incorporée	ATP DIT CaCl ₂	NaCl	MgCl ₂	Urée	Collagénase	Elastase
Normaux (n = 3)	2,1.10 ⁶ \pm 0,9.10 ⁶	760.000 \pm 329.500	1,01.10 ⁶ \pm 0,37.10 ⁶	412.100 \pm 123.600	285.000 \pm 61.100	25.200 \pm 10,500	68.200 \pm 6.200
Hyperlipémiques (n = 5)	1.35.10 ⁶ \pm 0.39.10 ⁶	400.190 \pm 78.400	465.000 \pm 62.000	210.200 \pm 76.400	126.900 \pm 27.400	31.500 \pm 7.600	39.960 \pm 10.600



à cette inhibition importante de l'activité biosynthétique des cellules musculaires lisses dans l'aorte en culture d'organe. Il paraît néanmoins probable que l'inhibition très nette de la biosynthèse de l'élastine, avec une activité élastasique croissante, puisse expliquer la perte rapide des fibres élastiques dans l'aorte athéromateuse.

c) Interaction entre les éléments circulants et la paroi artérielle

La déposition progressive des lipides et du calcium au niveau de l'aorte sont des notions classiques. Il a pu être montré récemment par HORNEBECK et PARTRIDGE que la fixation du cholestérol et du calcium se potentialisent mutuellement {64}. URRY a pu montrer, dans une série de travaux remarquables, que la fixation progressive du calcium à l'intérieur des fibres élastiques puisse être expliquée par la conformation même de la molécule de tropo-élastine (87). Des agrégats d' α -élastine coacervée forment aussi des matrices calcifiables (88). Ainsi, pourrait s'expliquer l'augmentation progressive du calcium dans l'élastine purifiée par la soude (LANSING (79)).

Nous avons déjà mentionné nos propres expériences concernant la fixation des lipides dans les fibres élastiques (voir Chapitre A). Ces études, avec celles de KRAMSCH et HOLLANDER (50-52) confirment la réalité de notre modèle (voir Figure 14) attribuant à la fixation des lipides un rôle important dans la perte d'élasticité

et dans l'accélération de l'élastolyse. Ces résultats ont été récemment confirmés et étendus par KAGAN et FRANZBLAU (49).
Quelle que soit la structure réelle de l'élastine polymérique, son "vieillissement" et sa dégradation commencent à recevoir une explication au niveau moléculaire et cellulaire.

4°/ Antigénicité de l'élastine, son rôle dans l'athérogénèse

L'une des conséquences du mécanisme de dégradation continue des fibres élastiques par des élastases est la libération continue dans la circulation de peptides solubles. Il nous a paru possible que ces peptides puissent éventuellement induire la formation d'anticorps et provoquer ainsi un conflit antigène-anticorps dans l'organisme, tel qu'on le rencontre dans certaines maladies autoimmuns.

Bien que l'élastine ait été considérée comme non antigénique par certains auteurs, nous avons réussi à obtenir des anticorps anti-élastine chez le lapin par immunisation avec l'élastine fibreuse ou l'élastine partiellement dégradée (κ -élastine) (cf. Fig. 33) {8, 10, 12}. La présence de "microfibrilles" dans l'élastine rend ces expériences difficiles, car les glycoprotéines de structure sont nettement plus immunogènes que l'élastine {27}.

Dans un deuxième temps, nous avons pu mettre en évidence, avec

Figure 33

Titres d'hémagglutination passive des serums de lapins immunisés avec l'élastine dans l'adjuvant complet de Freund. Les contrôles reçoivent du NaCl 0,9 % (o—o) ou de l'adjuvant de Freund \oplus {27}.

Antigène: Elastine-H + Freund

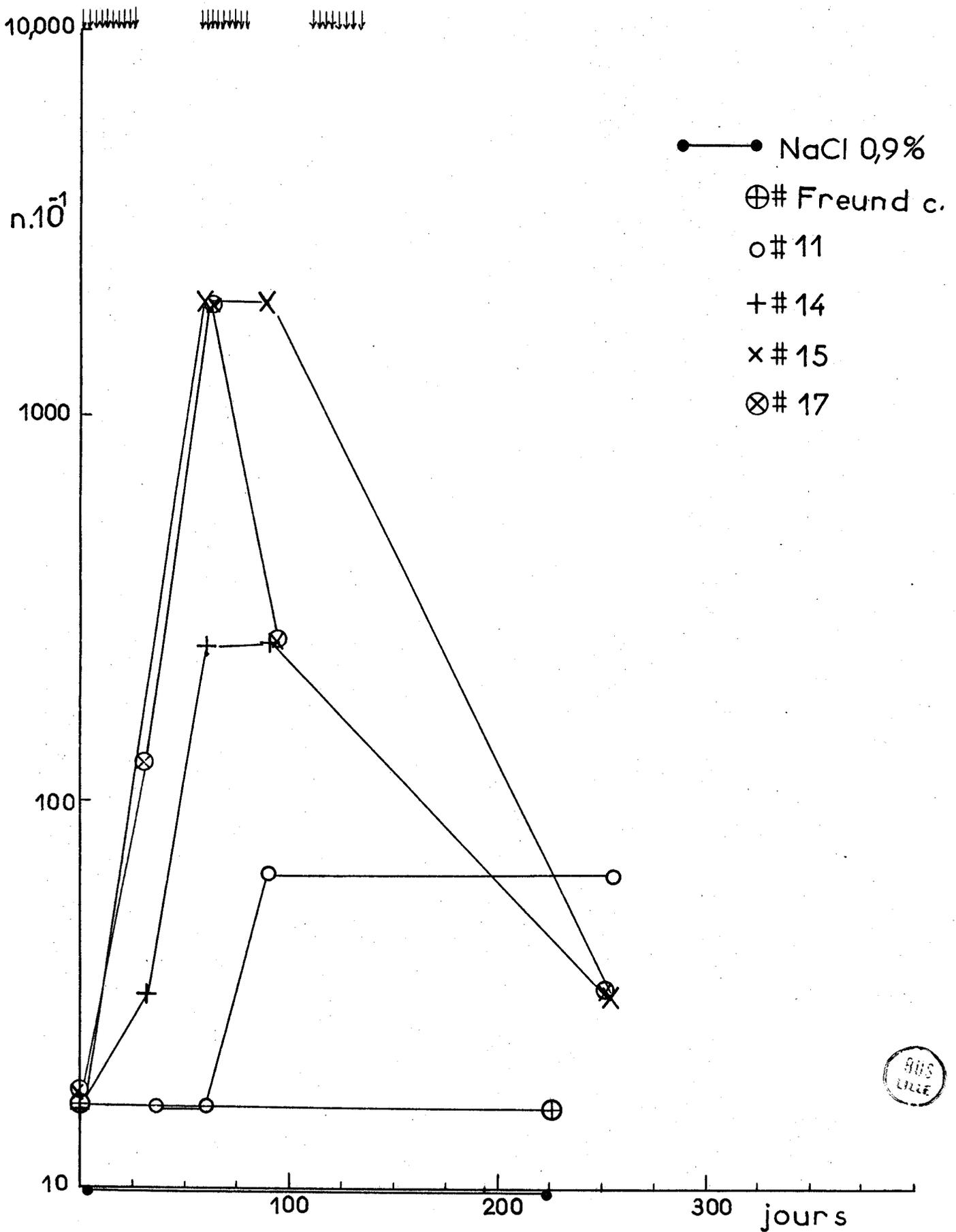
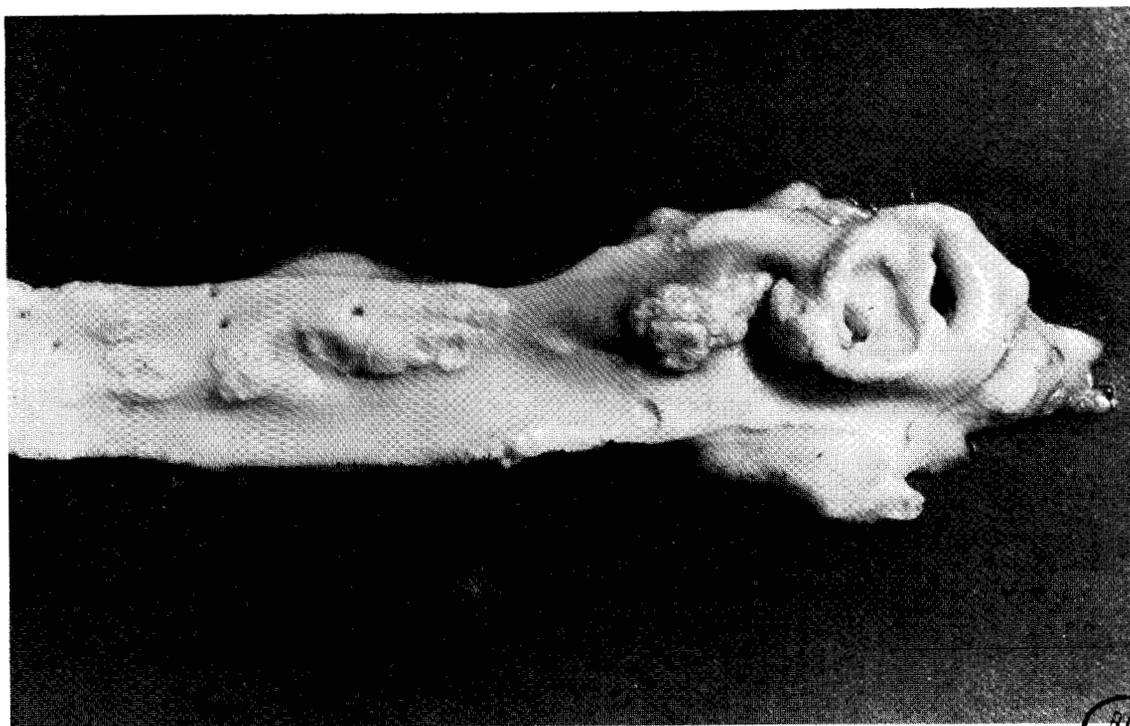


Figure 34

Lésions artérioscléreuses induites chez le lapin par immunisation avec la κ -élastine dans l'adjuvant complet de Freund.



BUS
LILLE

F. STEIN de Louvain, la présence d'anticorps anti-élastine dans le serum humain {5}. Ces anticorps apparaissent dès l'âge de 20 ans et leur titre ne baisse qu'après 80 ans. Plus récemment, nous avons pu reprendre ces études avec le Dr HORSCH de l'Institut du Prof. SCHESSLER de Heidelberg et montrer un taux élevé d'anticorps anti-élastine dans le serum de malades souffrant d'artérite de Burger. Il a été montré, par plusieurs auteurs et en particulier par SCEBAT et RENAI (89-91) que l'immunisation de lapins par des homogénats artériels provoque l'apparition de lésions calcifiées caractéristiques. Le fait que des protéines étrangères, tel que serum albumine, puissent aussi induire ce phénomène, paraissait en limiter l'intérêt.

Nous avons repris ces études en immunisant des lapins avec des extraits d'aorte de porc partiellement purifiés selon le schéma de la Figure 1 {27}. Nous avons pu montrer que seule l'élastine purifiée induit avec régularité des lésions artérioscléreuses (voir Figure 34). En injectant 5 mg d'élastine hautement purifiée, avec l'adjuvant complet de Freund, 2 fois par semaine, on provoque en 4 à 6 semaines l'apparition de lésions sévères, calcifiées allant parfois jusqu'à l'ulcération. Bien que la lipémie augmente au cours de l'immunisation, on n'observe pas de dépôts lipidiques importants. L'étude histologique et par microscopie électronique de l'aorte des animaux traités, révèle une altération profonde des structures élastiques avec fragmentation et désorganisation des fibres (voir Figure 35/A) et une homogénéisation très prononcée.

Il semble donc que l'immunisation avec l'élastine déclenche un phénomène d'élastolyse analogue à celui observé à l'état pathologique chez l'homme. Il existe néanmoins une différence essentielle entre l'immuno-artériosclérose provoquée par l'élastine et l'athéro-artériosclérose humaine, car cette dernière est riche en dépôts lipidiques. Néanmoins, la présence d'anticorps anti-élastine dans le serum humain, la présence d'immunoglobulines dans l'aorte au niveau des lésions du tissu élastique {21} suggèrent une réelle importance pour ce phénomène dans la pathologie humaine.

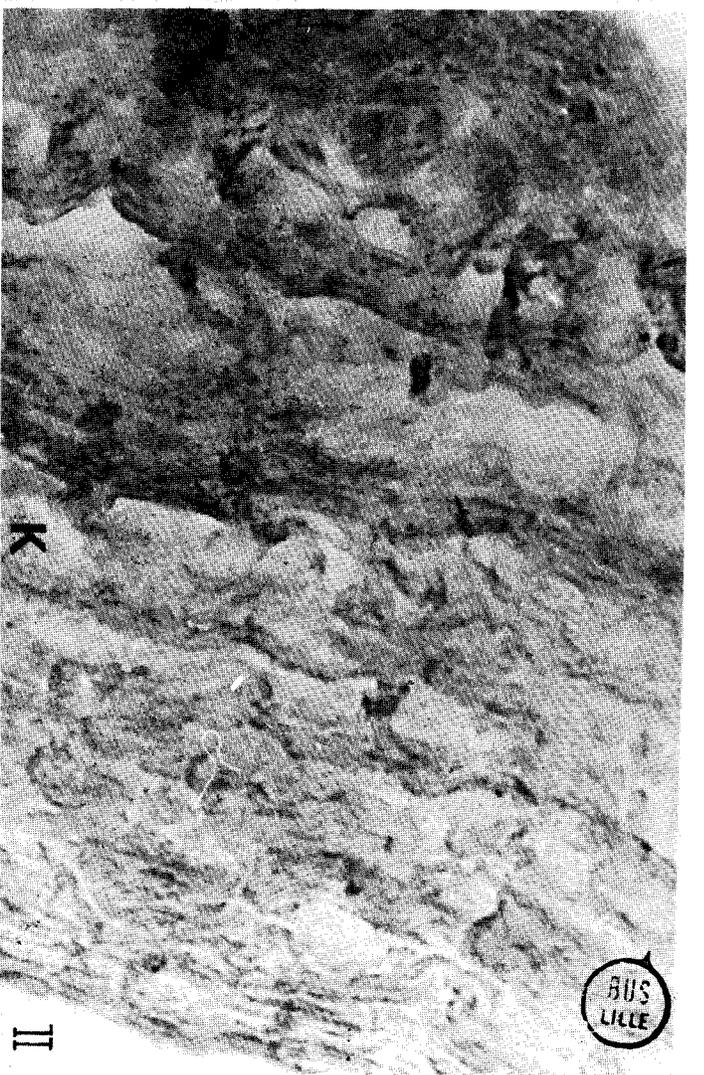
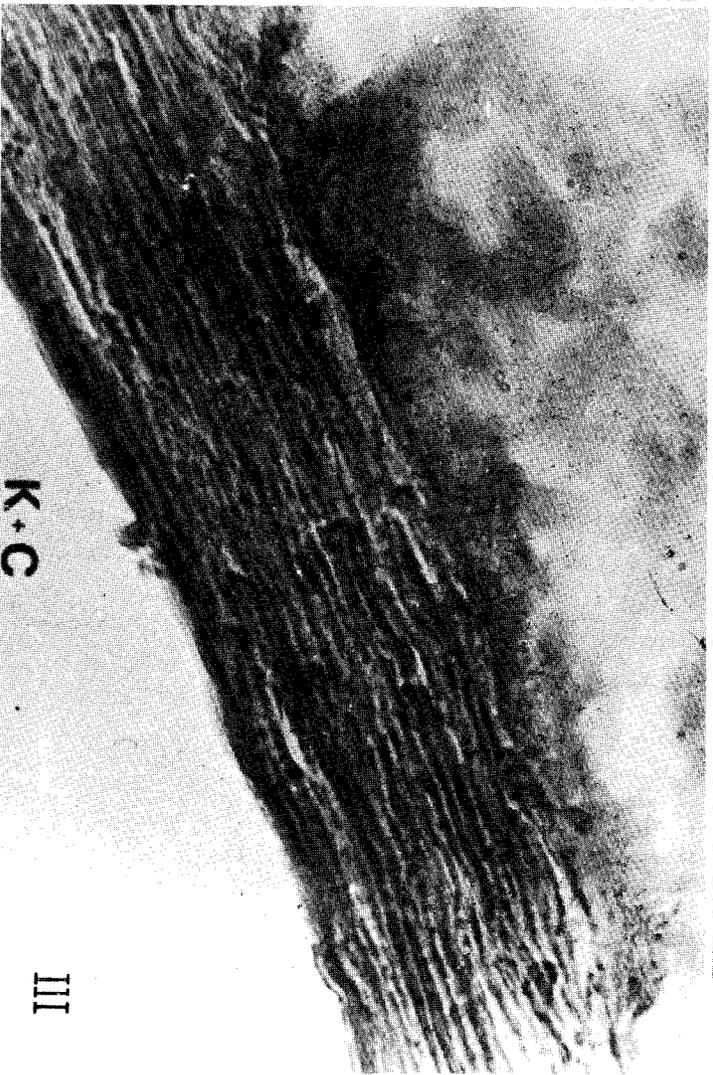
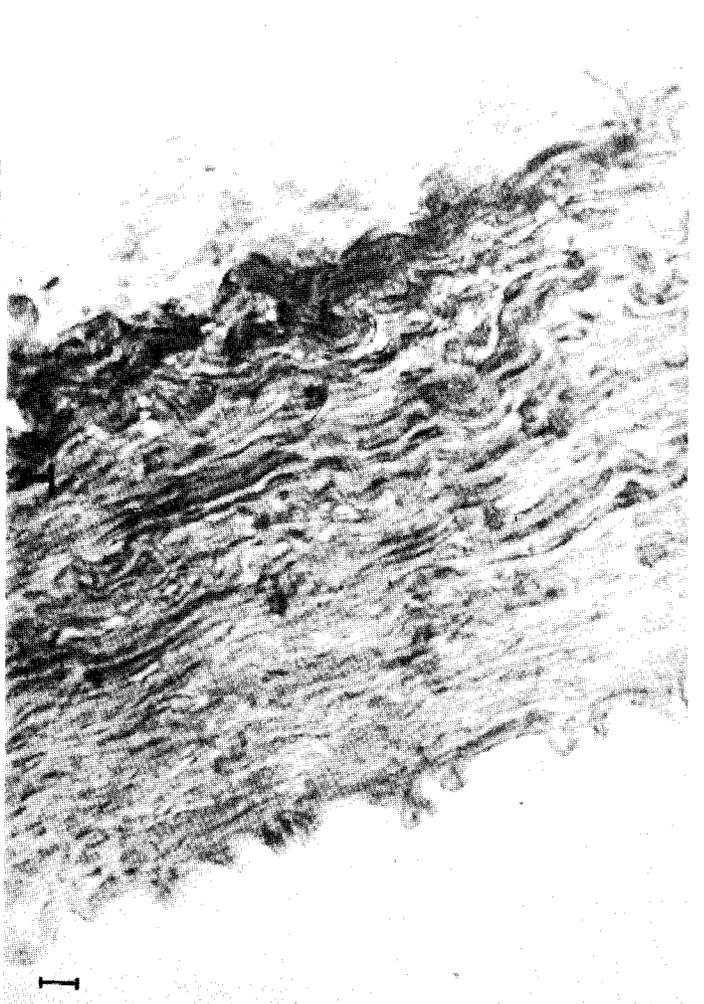
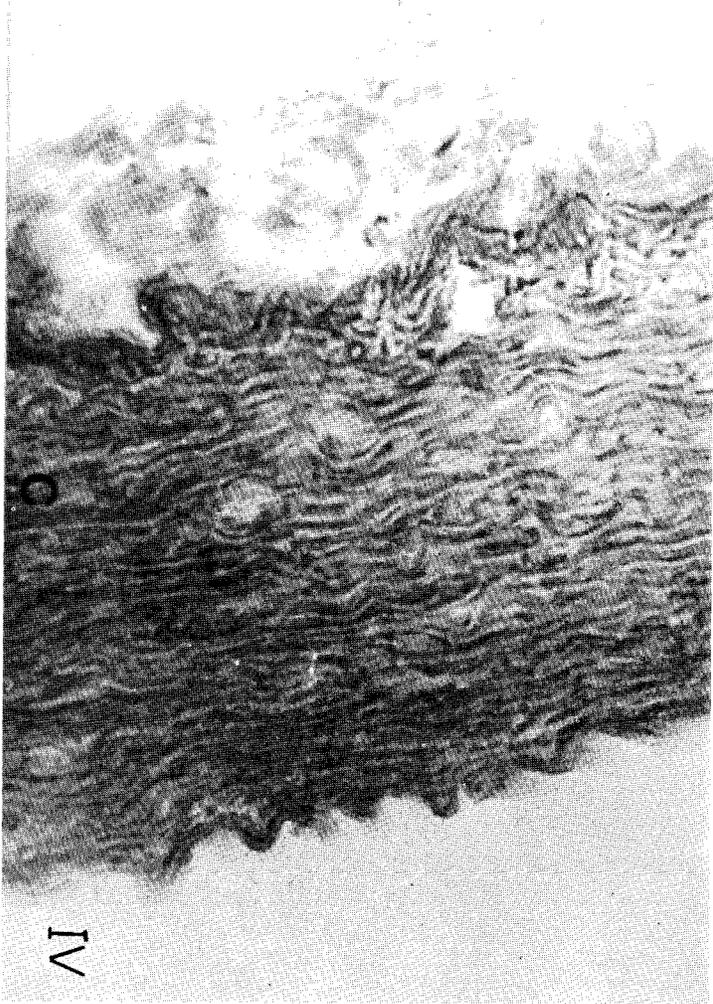
5°/ Effet de la calcitonine sur l'immuno-artériosclérose provoquée par la κ -élastine

Le fait que l'immunisation avec la κ -élastine provoque une artériosclérose à dépôt calcaire, suggère une influence possible de l'injection d'élastine sur le métabolisme du calcium. Nous avons donc décidé avec G. MILHAUD d'étudier l'effet de la calcitonine sur ce phénomène. Il est connu, en effet, que la calcitonine influence la fixation du calcium au niveau du stroma fibreux du tissu osseux (92). Des lapins ont été immunisés avec la κ -élastine et parallèlement traités avec la calcitonine (0,16 U MRC/2x jour). Après 6 semaines de ce traitement, on constate une nette protection des aortes de lapins traités à la calcitonine par rapport aux témoins non traités (voir Figure 35). Ces études (sous presse

Figure 35

Histologie des aortes de lapins immunisés avec la κ -élastine et protégés avec la calcitonine {80}.

- I Contrôles non traités
- II Immunisées avec la κ -élastine
- III Immunisées avec la κ -élastine et traitées simultanément avec la calcitonine.
- IV Lapins traités avec la calcitonine seule.



dans Biochemical Pharmacology), actuellement poursuivies avec la collaboration de D. BRECHEMIER, permettent d'aborder le mécanisme par lequel l'injection de κ -élastine provoque l'apparition de lésions artérielles importantes. Le fait qu'une hormone peptidique puisse influencer ce phénomène suggère l'intervention de relais endocriniens dont l'importance est soupçonnée depuis longtemps.

DISCUSSION

DISCUSSION

Les résultats relatés dans cette thèse peuvent être mis en parallèle maintenant avec les notions acquises au cours des dernières années sur la structure et le métabolisme de l'élastine. On admet aujourd'hui que les cellules musculaires lisses (ou d'autres cellules productrices d'élastine) secrètent un précurseur soluble de la future élastine polymérique. Deux concepts sont à l'étude actuellement : le premier, proposé par CARNES *et al* (13), SANDBERG *et al* (14), SYKES et PARTRIDGE (93), considère la tropoélastine comme le précurseur secrété par les cellules. Cette tropoélastine, d'un poids moléculaire de 74000 environ, serait ensuite incorporée dans l'élastine polymérique à la suite de l'oxydation de certains résidus de lysine par une lysinoxydase spécifique, en allysine (δ semi-aldéhyde de l'acide α amino adipique) et par formation de liaisons intercaténares à la suite de la cyclisation de 4 résidus de lysine pour former un résidu de desmosine ou d'isodesmosine. Il n'est pas de notre propos de discuter ici la biochimie détaillée du pontage ; les revues récentes de HAN *et al* (94) et de GALLOP et PAZ (95) donnent à ce sujet les renseignements les plus actuels.

Il est admis actuellement que la desmosine relie deux molécules de tropoélastine seulement, les modèles comportant une molécule de desmosine reliant 3 ou 4 molécules de tropoélastine paraissent actuellement écartés.

Une deuxième hypothèse a été proposée récemment par J. FOSTER *et al* (96) selon laquelle le précurseur néosynthétisé de l'élastine serait une molécule beaucoup plus grande que la tropoélastine, d'environ 150.000 daltons. Cette proélastine serait clivée par une protéase spécifique, la tropoélastase, en molécules de plus en plus petites ; l'une des étapes intermédiaires correspondrait à la tropoélastine. Des arguments solides supportent cette hypothèse qui, selon notre avis, a toute chance de se vérifier. La partie clivée de la molécule de proélastine aurait une composition très différente de celle de l'élastine ; elle comporterait de l'hydroxyproline, des acides aminés polaires (Glu, Asp) et des chaînes glycaniques. Des ponts disulfures pourraient relier cette partie de la molécule aux microfibrilles avant le clivage protéolytique. La tropoélastase est d'ailleurs fortement associée à la proélastine. On peut les séparer seulement après la précipitation du collagène (96). Le pontage pourrait commencer par l'action de la lysinoxydase sur la proélastine fixée sur les microfibrilles. Selon HARRIS (communication personnelle) la composition en acides aminés de la lysinoxydase serait similaire à celle des glycoprotéines de structure. Il n'est donc pas impossible que la lysinoxydase soit étroitement associée aux microfibrilles glycoprotidiques.

Ces considérations sont compatibles, entre autre, avec nos résultats sur l'activité spécifique élevée de la desmosine retrouvée dans l'hydrolysât collagénasique des aortes de lapins jeunes, incubées en culture d'organe avec la lysine-¹⁴C (voir Tableau XIV). On peut s'attendre, d'après les résultats de FOSTER, à ce que la dégradation du collagène par la collagénase libère des unités de tro-po-élastine en train d'être pontées.

Selon ces hypothèses, le pontage et le clivage protéasiques de la proélastine seraient des processus parallèles et simultanés.

Une autre conséquence de ce concept serait la possibilité de synthétiser une proélastine valable, mais qui, faute d'activité normale d'une tropoélastase, ne peut pas s'incorporer dans une trame élastique parfaitement réticulée, même si les liaisons intercaténaïres se forment entre deux molécules voisines de proélastine. Cette situation serait analogue à celle créée par l'absence de procollagène-peptidase dans la dermatosparaxie et conduirait à une trame élastique fragile. Il n'est pas impossible que la maladie de Marfan, ou d'autres états pathologiques accompagnés d'aneurysmes, puissent trouver un jour une telle explication.

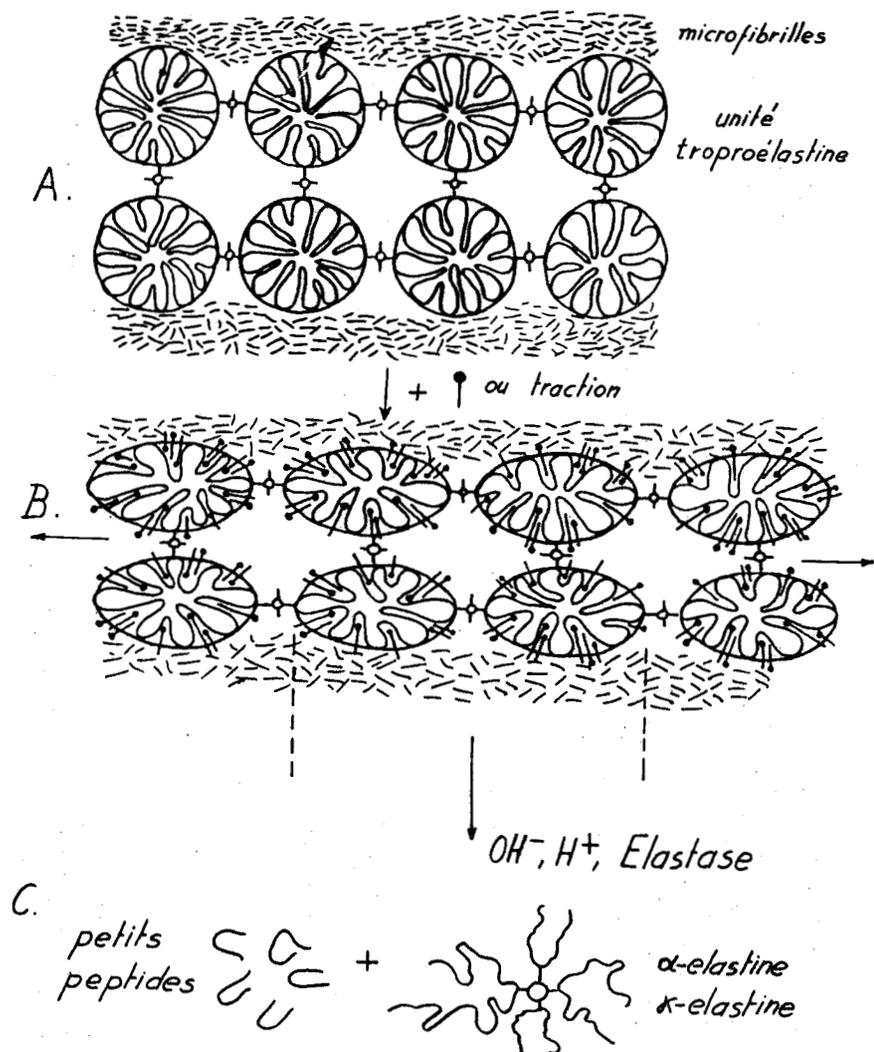
Il n'est pas impossible d'envisager non plus que l'enrichissement en acides aminés polaires de l'élastine vieillissante (71) et de l'élastine des plaques d'athérome (40), soit en partie, au moins, explicable par un tel mécanisme.

Quelle que soit la nature du précurseur de l'élastine polymérique, celle-ci possède bien des propriétés physicochimiques uniques qui peuvent être imputées en très grande partie à sa nature hydrophobe. Nos expériences, relatées dans le premier Chapitre (A) de cette thèse, ont été, selon notre connaissance, les premières à mettre en évidence et rendre physicochimiquement "quantifiables" ces propriétés de l'élastine. Les études récentes de URRY (97) ont d'ailleurs confirmé le fait que les produits d'hydrolyse partielle de l'élastine, l' α -élastine de PARTRIDGE et notre κ -élastine, possèdent, dans une certaine mesure, les propriétés conformationnelles nécessaires à la fibrillogénèse telles que la coacervation et la conformation où alternent des α -hélices et des "feuilles plissées β ". Des propriétés essentielles de l'élastine, telles que l'affinité pour le calcium et pour les lipides, se retrouvent aussi au niveau de ces peptides solubles. Les résultats que nous avons obtenus concernant la forte affinité pour les lipides de l'élastine ont l'avantage d'être indépendants du modèle que l'on accepte pour la structure tridimensionnelle des fibres élastiques. La Figure 36 montre l'application de notre théorie hydrophobe, au modèle dit "corpusculaire" proposé par PARTRIDGE(98,99). L'insertion d'acides gras (représentés par des \dot{I}) modifiera la conformation des unités tropoélastiques reliées par des ponts desmosine et provoquera une perte d'élasticité et augmentera le nombre des sites de fixation des élastases.

Les effets produits par la fixation des lipides seront essentielle-

Figure 36

Modèle "corpusculaire" de l'élastine selon PARTRIDGE. Des unités de tropoélastine sont reliées par des ponts de desmosome et sont bordées de microfibrilles. L'insertion d'acides gras (ou d'autres lipides) représentés par des \uparrow déforme les molécules de tropoélastine et modifie leur conformation, facilitant l'hydrolyse par les élastases.



ment identiques, que l'on choisisse le modèle corpusculaire (Figure 36) ou le modèle fibrillaire (Figure 14) proposé par GOTTE (100).

Le modèle de PARTRIDGE avait l'avantage d'expliquer la formation de structures lamellaires tels que les tuyaux élastiques concentriques de l'aorte. Le modèle fibrillaire est compatible avec la morphologie des fines fibrilles élastiques visibles entre les lames concentriques et aussi avec la morphologie des fibres élastiques des autres tissus (peau, sclère, cartilage). Il nécessite par contre des modifications pour le rendre apte à expliquer l'association latérale des fibres en lames concentriques telles qu'on les voit dans l'aorte. Le choix définitif du modèle doit, à notre avis, attendre l'élucidation du mécanisme de biosynthèse et du pontage de l'élastine. En tout état de cause, l'affinité très prononcée de l'élastine pour le cholestérol et ses esters et pour les acides gras, doit être considérée comme une propriété essentielle pouvant expliquer sa dégradation et son "vieillissement" (perte d'élasticité). C'est à cet égard que nos expériences apportent probablement les données les plus utiles non seulement pour le biochimiste mais aussi pour le médecin et pour le nutritionniste. Il paraît probable que la nature des lipides fixés dans la fibre élastique reflète, dans une certaine mesure, la composition du régime alimentaire. Les grandes différences constatées entre la vitesse de développement de la maladie artérielle d'une région et d'une ethnie à l'autre, pourraient être expliquées par ces résultats.

Quant aux résultats relatés dans le deuxième Chapitre (B) concernant la cinétique de l'action des élastases, nous pouvons en tirer plusieurs conclusions d'ordre physiopathologique. On connaît aujourd'hui plusieurs protéases à activité élastinolytique { 46 }, élaborées par plusieurs types cellulaires. Les deux nouvelles élastases que nous avons mises en évidence, celles des plaquettes sanguines { 13 } et de l'aorte { 43 } contribuent, selon toute probabilité, à la dégradation progressive de l'élastine en fonction de l'âge et dans l'artériosclérose. L'adsorption très forte des élastases sur l'élastine fibreuse, phénomène que nous avons mis en évidence dès 1957 {2}, explique en partie l'efficacité de ces enzymes. Il est beaucoup plus difficile d'inhiber une enzyme adsorbée sur son substrat qu'une enzyme diffusant librement en solution. Ceci explique probablement l'inefficacité relative des inhibiteurs sériques des élastases que nous avons mises en évidence avec G. TURINO { 45 }. Nos expériences cinétiques montrent que l'enzyme ne diffuse librement sur une autre fibre élastique qu'après avoir partiellement dégradée la fibre sur laquelle elle a été adsorbée. Ces résultats, avec ceux de BIETH sur l'inefficacité de l' α_2 -macroglobuline à inhiber l'élastase (et possédant pourtant une très forte affinité pour celle-ci) (101), expliquent peut-être le mécanisme de la genèse de l'emphysème pulmonaire. Une élastolyse limitée pourrait bien abolir l'élastine de la trame élastique pulmonaire tout en conservant à celle-ci en grande partie ses affinités tinctoriales.

Nous possédons encore peu de données sur les propriétés physico-chimiques et cinétiques des élastases cellulaires et tissulaires et devons donc nous contenter souvent d'extrapoler des études effectuées avec l'élastase pancréatique. La similitude physico-chimique et immunologique de celle-ci avec l'enzyme purifiée à partir de l'aorte, justifie, dans une certaine mesure, ces spéculations.

Quelle que soit l'origine de l'élastase aortique, son augmentation avec l'âge, et encore plus dans l'artériosclérose, est un phénomène frappant et très probablement en rapport direct avec les observations morphologiques et physiopathologiques concernant le vieillissement artériel et la dégradation de l'élastine dans l'artériosclérose.

Le 3ème Chapitre de notre thèse relate, en partie, nos expériences sur les glycoprotéines de structure de l'aorte et leur rapport aux "microfibrilles". Ces structures morphologiques distinctes ont été reconnues par plusieurs auteurs en dehors du tissu élastique grâce à la microscopie électronique (65 - 70). Nous avons établi un parallèle entre ces observations morphologiques et nos résultats biochimiques pour proposer une théorie générale de l'élastogénèse basée sur l'interaction entre tropo- (ou pro-) élastine et les microfibrilles.

La microhétérogénéité très prononcée des copules glucidiques isolées{16,17} et la ressemblance de la composition d'acides aminés

entre toutes les glycoprotéines de structure isolées à partir de nombreux tissus, rendent difficile de se prononcer sur l'identité des GPS isolées à partir d'élastine purifiée (voir Tableaux XII-XIII) ou sur la nature distincte de ces glycoprotéines. Le poids moléculaire très variable rapporté par les substances isolées et purifiées (MOSCHETTO 12500 (73), MOCZAR *et al* 35000 {76}, BORNSTEIN et ROSS 120000 (74)) rend encore plus difficile cette distinction. ANDERSON, dans sa revue récente sur les glycoprotéines du tissu conjonctif, se prononce en faveur d'une nature distincte de ces GPS-microfibrillaires (102).

En toute hypothèse, il semble aujourd'hui généralement admis que des glycoprotéines de structure existent au niveau du tissu élastique, qu'elles soient synthétisées par les cellules mésenchymateuses et qu'elles possèdent une forte affinité pour les fibres de collagène et d'élastine. Ces propriétés, en partie démontrées par nos expériences, étayent l'hypothèse que nous avons émise concernant le rôle morphogénétique de ces glycoprotéines au cours de la synthèse vectorielle (orientée) des fibres élastiques.

Le dernier Chapitre (D) de notre travail concerne les mécanismes présidant aux modifications constatées dans le tissu élastique en fonction de l'âge et dans l'artériosclérose. La forte diminution de l'activité biosynthétique des cellules musculaires lisses en culture d'organe, dans la mesure où elle est extrapolable à l'animal vivant, pourrait expliquer la lenteur du renouvellement



ou de la réparation de notre capital élastique entamé par l'imbibition lipidique et par l'action croissante des élastases.

La comparaison des études faites en culture d'organe et en culture cellulaire ont permis de suggérer l'existence d'au moins deux types de régulations distinctes, l'une dépendant étroitement de l'interaction matrice-cellule, l'autre étant probablement codée dans le génome. La première régulation (matrice-dépendante) paraît être responsable de la diminution progressive de l'activité biosynthétique des cellules musculaires lisses avec l'âge *in situ* dans l'aorte. La deuxième (matrice indépendante) déterminerait la qualité des macromolécules synthétisées et "exportées" par les cellules.

L'étude expérimentale de ce phénomène pathologique a été rendue plus accessible par la mise au point d'une méthode reproductible de production de lésions artérielles accompagnées de dégradation des fibres élastiques et de la formation de dépôts calcaires. L'artériosclérose, provoquée par immunisation avec l'élastine, a permis de reproduire expérimentalement les phénomènes que l'on observe au cours du vieillissement de la paroi artérielle : élastolyse et calcification. Ces deux phénomènes paraissent être indépendants de la formation de dépôts lipidiques sous-intimaux. La démonstration récente de l'inhibition de ce phénomène par administration quotidienne de calcitonine promet d'aboutir à des résultats pharmacologiques applicables à l'homme. Cet effet

pose le problème du mécanisme de déclenchement de la lésion artérielle consécutive à l'injection de κ -élastine et suggère la possibilité d'intervention de relais endocriniens.

L'ensemble de nos résultats reflète l'effort poursuivi depuis plus de vingt ans par notre laboratoire pour arriver à une compréhension au niveau cellulaire et moléculaire de la biosynthèse de l'élastine, de sa structure et de son métabolisme à l'état normal et pathologique.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

Après une brève introduction récapitulant succinctement l'historique du sujet, nous exposons nos résultats obtenus sur la structure de l'élastine et le mécanisme d'action des élastases en 4 Chapitres.

Le premier Chapitre (A) traite des propriétés physicochimiques de l'élastine. L'étude de la cinétique de son hydrolyse alcaline en milieu aqueux-organique a permis de mettre en évidence le rôle prépondérant des interactions hydrophobes dans la résistance des fibres élastiques aux attaques chimiques et enzymatiques. Une échelle d'efficacité a pu être définie pour les solvants organiques qui accélèrent l'hydrolyse alcaline. Cette efficacité dépend de la présence d'une fonction polaire (ou alcoolique, par exemple) et d'une chaîne alkyl suffisamment longue. Cet effet des solvants organiques a permis de prévoir et de vérifier la forte affinité de l'élastine pour des lipides.

Nous avons pu montrer que le cholestérol- ^{14}C , administré *per os* à des rats, se fixe dans les fibres élastiques et n'est libéré qu'après hydrolyse des fibres. L'élastine purifiée à partir d'aortes humaines contient aussi des lipides dont la quantité augmente avec la sévérité de la lésion athéroscléreuse. L'élastine

agit donc comme une éponge sélective pour le cholestérol et ses esters et les acides gras libres. La fixation des lipides abolit l'élasticité de l'élastine et accélère l'élastolyse enzymatique.

Le deuxième Chapitre (B) relate les expériences de cinétique enzymatique montrant la très forte adsorption de l'élastase sur l'élastine. L'utilisation de l'élastine marquée à l'iode (^{125}I et ^{131}I) a permis de montrer que l'enzyme ne peut diffuser d'une fibre à l'autre qu'après l'hydrolyse d'un certain nombre de liaisons peptidiques. La modification de la conformation des fibres partiellement hydrolysées diminue l'efficacité de l'enzyme pour son substrat et facilite sa dissociation. La mesure de la surface spécifique de l'élastine avec le ^{85}Kr , et par micro-calorimétrie à flux continu, a permis de calculer la surface couverte par l'enzyme à différents degrés de saturation. La phase linéaire d'adsorption paraît être compatible avec l'existence de sites de fixation spécifiques (probablement des groupes carboxyliques). Le nombre de ces sites augmente avec la saturation lipidique (apport de carboxyles par les acides gras).

Deux nouvelles élastases ont été isolées et partiellement caractérisées, l'une à partir des plaquettes sanguines, l'autre à partir de l'aorte. Leur rôle respectif dans la dégradation de l'élastine est discuté à la lumière d'expériences montrant l'augmentation de l'activité élastasique de l'aorte avec l'âge et l'artériosclérose.

Le troisième Chapitre (C) contient les études sur les glycoprotéines associées à l'élastine, leur isolement et caractérisation. Leur composition en acides aminés, en carbohydrates, leurs propriétés physicochimiques et immunologiques permettent de les rapprocher des glycoprotéines de structure isolées à partir de la paroi artérielle. Les deux ont une configuration microfibrillaire sous microscopie électronique.

La biosynthèse active de ces glycoprotéines pour les cellules musculaires lisses en culture d'organe, est compatible avec l'hypothèse que nous avons proposée concernant le rôle de ces glycoprotéines dans la formation de fibres et lames élastiques : guidage et orientation du pontage des molécules de tropoélastine associées à la trame microfibrillaire.

Le quatrième Chapitre (D) de notre thèse comporte les expériences sur le vieillissement du tissu élastique et sur sa modification dans l'artériosclérose. Nous avons observé, en culture d'organe d'aorte de lapin, une forte diminution (par cellule) de l'activité biosynthétique avec l'âge de l'animal. La biosynthèse de l'élastine réticulée (déterminée par l'incorporation de la lysine-¹⁴C dans la desmosine) diminue fortement avec l'âge. Chez le jeune animal on peut isoler de la desmosine à très forte activité spécifique à partir de l'hydrolysât collagénasique de l'aorte. Cette constatation est expliquée par l'existence d'oligomères

de tropo- (ou pro-)élastine fraîchement pontés et non encore incorporés dans les fibres insolubles.

En culture cellulaire (en absence de stroma), on ne constate pas le ralentissement de l'activité biosynthétique des cellules musculaires lisses avec l'âge de l'animal. Le rapport de synthèse des glycoprotéines et des glycosaminoglycannes change par contre, suggérant l'existence d'une régulation dépendant de l'interaction cellule-stroma et d'une autre (probablement codée dans le génome) qui n'en dépend pas.

Nous avons montré que l'immunisation des lapins avec la κ -élastine induit une artériosclérose caractérisée par une dégradation très lente des fibres élastiques et par la formation de dépôts calcaires. Ce modèle permet l'étude expérimentale du phénomène d'élastolyse constaté en pathologie humaine.

L'administration quotidienne de calcitonine inhibe le développement de cette immuno-artériosclérose. Ce résultat pose le problème du mécanisme d'action des injections de κ -élastine (intervention de relais hormonaux) et permet l'espoir d'une application à la pathologie humaine.

o o o o

REFERENCES

- 1 - G.M. HASS, Arch. Pathol. 27, 334 (1939)
- 2 - J. GROSS, J. Gerontol. 5, 343 (1950)
- 3 - E.W. DEMPSEY et A.I. LANSING, Int. Rev. Cytol. 3, 437 (1954)
- 4 - Z. FELSHER, dans "Physiology and Biochemistry of Skin" (S. Rothman ed.) pp 391-417 (Univ. of Chicago Press, Chicago, Ill) (1954)
- 5 - D.A. HALL, Intern. Rev. Cytol. 8, 211 (1959)
- 6 - D.A. HALL, "The Chemistry of Connective Tissue" (Thomas, Springfield, Ill) (1961)
- 7 - D.A. HALL, dans "Colloque sur la Biochimie du Tissu Conjonctif" (P. Boulanger ed.) pp. 165-180 (Masson, Paris) (1963)
- 8 - S.M. PARTRIDGE, Advan. Protein Chem. 17, 227-302 (1962)
- 9 - S.M. PARTRIDGE, dans "Colloque sur la biochimie du tissu conjonctif" (P. Boulanger ed.) pp 133-149 (Masson, Paris) (1963)
- 10 - S.M. PARTRIDGE, H.F. DAVIS et G.S. ADAIR, dans "Connective Tissue" (R.E. Tunbridge ed) pp. 22-237 (Thomas, Springfield, Ill.) (1957)
- 11 - S.M. PARTRIDGE, dans "Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix" (E.A. Balazs ed.) pp 593-616 (Acad. Press, London/New-York) Vol. 1 (1970).

- 12 - J.P. AYER, dans "Intern. Review of Connective Tissue Research" (D.A. Hall ed.) pp.33-100 (Acad. Press, N.Y./London) Vol. 2 (1964)
- 13 - W.H. CARNES, dans "Intern. Review of Connective Tissue Research" (D.A. Hall ed.) pp 197-232 (Acad. Press, N.Y./London) Vol. 4 (1968)
- 14 - L.B. SANDBERG, dans "Intern. Review of Connective Tissue Reserach" (D.A. Hall ed.) pp 160-210 (Acad. Press, N.Y./London) Vol. 7 (1976)
- 15 - W. GRAY, dans "Advances in Experimental Medicine in Biology" (L.B. Sandberg et C. Franzblau eds) (Plenum Press) 1977 sous presse.
- 16 - S.O. ANDERSEN et T. WEIS-FOGH, Adv. Insect. Physiol. 2, 1 (1964)
- 17 - I. BANGA, Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. 3, 317 (1952)
- 18 - J. BALO et I. BANGA, Biochem. J. 46, 384 (1950)
- 19 - D.M. SHOTTON et B.S. HARTLEY, Nature 225, 802-806 (1970)
- 20 - H.C. WATSON, D.M. SHOTTON, J.M. COX et H. MUIRHEAD, Nature 225, 806-811 (1970)
- 21 - D.M. SHOTTON et H.C. WATSON, Nature 225, 811-816 (1970)
- 22 - J. BIETH, dans "Frontiers of Matrix Biology" (L. Robert et J. Bieth eds) Vol. 7 "Elastine and Elastases" (Karger, Basel) 1977 sous presse.
- 23 - A.I. LANSING, dans "Symp. on Atherosclerosis" Publication 338 de National Acad. Sci., National Res. Council (1955)
- 24 - F.W. KEELY et S.M. PARTRIDGE, Atherosclerosis 19, 287 (1974)
- 25 - D.M. WEIR, "Handbook of Experimental Immunology" (Blackwell Sci. Pub., Oxford et Edimbourg) (1967)

- 26 - D.M. SHOTTON, B.S. HARTLEY, N. CAMERMAN, T. HOFFMANN, S.C. NYBURG et L. RAO, J. Mol. Biol. 32, 155-156 (1968)
- 27 - J. BIETH, M. PICHOT et P. METAIS, Febs Letters 8, 319 (1970)
- 28 - O.H. LOWRY, N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR et R.J. RANDALL, J. Biol. Chem. 193, 265 (1959)
- 29 - R.F. ITZHAKI, D.M. GILL, Anal. Biochem. 9, 401 (1964)
- 30 - J. MONTREUIL et G. SPIK, "Microdosage des Glucides" Monogr. N° 2 Lab. Chim. Biol. Fac. Sci. Lille (1968)
- 31 - I. BERGMAN et R. LOXLEY, Anal. Chem. 35, 1961 (1963)
- 32 - D. GLICK, "Methodes of Biochemical Analysis" (Interscience Pub. Inc., N.Y./London) Vol. 2 (1955)
- 33 - C. GROS, B. LABOUESSE, Europ. J. Biochem. 7, 463 (1969)
- 34 - K.K. HAN, "Modifications et Coupures Chimiques des Protéines : Application à l'Etude de la Structure Primaire des Myoglobines de Cheval et de Boeuf" Thèse Doctorat Biologie Humaine, Fac. Med et Pharm. de Lille, 17/11/70
- 35 - L.B. SANDBERG et C. FRANZBLAU, "Advances in Experimental Medicine in Biology" (Plenum Press) 1977 sous presse.
- 36 - A. EYRING et A.E. STEARN, Chem. Rev. 24, 253, 1939
- 37 - S.S. SUNG, "Etude énergétique de la thermodénaturation de deux isohémagglutinines humaines" Thèse Doctorat ès Sciences Physiques, Paris 1958
- 38 - R. LUMRY et S. RAYENDAR, Biopolymers 9, 1125 (1970)

- 39 - H.M. KAGAN, G.D. CROMBIE et R.E. JORDAN, *Biochemistry* 11, 3412-3418 (1972) ;
R.E. JORDAN, N. HEWITT, W. LEWIS, H. KAGAN et C. FRANZBLAU, *Biochemistry*
13, 3497-3503 (1974)
- 40 - C.A.J. HOEVE et P.J. FLORY, *J. Am. Chem. Soc.* 80, 6523 (1958)
- 41 - G. NEMETHY et H.A. SCHERAGA, *J. Chem. Phys.* 36, 3382 (1962)
- 42 - G. NEMETHY et H.A. SCHERAGA, *J. Chem. Phys.* 36, 3401 (1962)
- 43 - G. NEMETHY et H.A. SCHERAGA, *J. Phys. Chem.* 66, 1773-1789 (1962)
- 44 - J.A. FOSTER, C. BRUENGER, W.R. GRAY et L.B. SANDBERG, *J. Biol. Chem.*
248, 2876 (1973)
- 45 - D.W. URRY, *Biochim. Biophys. Acta* 265, 115-168 (1972)
- 46 - T. WEIS-FOGH et S.O. ANDERSON, *Nature* 227, 718 (1970)
- 47 - J.M. GOSLINE, dans "Intern. Review of Connective Tissue Research" (D.A. Hall
ed) pp 211-250 (Acad. Press, N.Y./London) Vol. 7 (1976)
- 48 - D.P. MUKHERJEE, A.S. HOFFMAN et C. FRANZBLAU, *Biopolymers* 13, 2447-2459
(1974)
- 49 - D.P. MUKHERJEE, H.M. KAGAN, R.E. JORDAN et C. FRANZBLAU, *Connective Tissue
Res.* 4, 177-180 (1976)
- 50 - D.M. KRAMSCH, C. FRANZBLAU et W. HOLLANDER, *J. Clin. Invest.*, 50, 1666-1677
(1971)
- 51 - D.M. KRAMSCH, I. GORE et W. HOLLANDER, *J. Atheroscler. Res.* 7, 501 (1967)
- 52 - D.M. KRAMSCH, W. HOLLANDER et C. FRANZBLAU, dans "Atherosclerosis" Second
Intern. Symp. (R.J. Jones, ed.) p. 115 (Springer-Verlag, N.Y.) (1970).

- 53 - A.G. TSUK et G. OSTER, Nature 190, 721 (1961)
- 54 - A. GERTLER, Eur. J. Biochem. 20, 541 (1971)
- 55 - F.C. GREENWOOD et W.M. HUNTER, Biochem. J. 89, 114 (1963)
- 56 - C. LARGMAN, J.W. BRODRICK et M.C. GEOKAS, Biochemistry 15, 2491-2500 (1976)
- 57 - P.A. MALLORY et J. TRAVIS, Biochemistry 14, 722-730 (1975)
- 58 - A. JANOFF et J. SCHERER, J. Exp. Med. 128, 1137 (1968)
- 59 - K. OHLSSON et I. OLSSON, Eur. J. Biochem. 42, 519-527 (1974)
- 60 - Z. WERB et S. GORDON, J. Exper. Med. 142, 361-377 (1975)
- 61 - J.O. HARRIS, G.N. OLSEN, J.R. CASTLE et A.S. MALONEY, Amer. Rev. Resp. Dis. 111, 579-586 (1975)
- 62 - P.M. STARKEY et A.J. BARRETT, Biochem. J. 155, 255-263 (1976)
- 63 - M.C. GEOKAS, J.W. BRODRICK, J.H. JOHNSON et C. LARGMAN, J. Biol. Chem. 252, 61-67 (1977).
- 64 - W.A. LOEWEN, dans "Intern. Review of Connective Tissue Research" (D.A. Hall ed.) p. 183 (Acad. Press, N.Y./London) Vol. 1 (1963)
- 65 - M.D. HAUST, R.H. MORE, S.A. BENCOSME, J.U. BALIS, Exp. Mol. Pathol. 4, 508-524 (1965)
- 66 - J. WEISMAN et W.H. CARNES, Am. J. Pathol. 54, 107 (1969)
- 67 - R. ROSS et P. BORNSTEIN, J. Cell. Biol. 40, 366 (1969)
- 68 - T.K. GREENLEE Jr., R. ROSS et J.L. HARTMANN, J. Cell. Biol. 30, 59 (1966)

- 69 - F.N. LOW, Anat. Rec. 142, 131 (1962)
- 70 - H.E. KARRER, J. Ultrastruct. Res. 2, 96 (1958) ; 4, 420 (1960) ; 5, 1 (1961)
- 71 - Y. MOSCHETTO, M. DE BACKER, O. PIZIEUX, H. BOUISSOU, M.T. PIERAGGI et M. JULIAN, Paroi Artérielle 2, 161-177 (1974)
- 72 - M.J. BARNES et S.M. PARTRIDGE, Biochem. J. 109, 883 (1968)
- 73 - M. DAVRIL et Y. MOSCHETTO, Rev. Europ. Etudes Clin. et Biol. 17, 102-106 (1972)
- 74 - L.W. MUIR, P. BORNSTEIN et R. ROSS, Eur. J. Biochem. 64, 105-114 (1976)
- 75 - E. MOCZAR, Pathol. Biol. (1977) sous presse.
- 76 - J.P. MAUGER, M. WORCEL, J. TASSIN et Y. COURTOIS, Nature 225, 337-375 (1975)
- 77 - A. MACIERA-COELHO, dans "Frontiers of Matrix Biology" (L. Robert et B. Robert eds). Vol. 1 "Aging of Connective Tissues, Skin" pp. 46-77 (Karger, Basel) (1973).
- 78 - Y. STEIN et O. STEIN, dans "Exposés Annuels de Biochimie Médicale" (P. Boulanger, M.F. Jayle et J. Roche eds). pp 97-110 (Masson, Paris) 31 (1972)
- 79 - A.I. LANSING, M. ALEX et T.B. ROSENTHAL, J. Gerontol. 5, 112-119 (1950)
- 80 - S.Y. YU et H.T. BLUMENTHAL, J. Gerontol. 119-134 (1963)
- 81 - E.B. SMITH et R.S. SLATER, The Lancet, 26 Févr., 463-469 (1972)
- 82 - A. WAREMBOURG, M. BERTRAND, G. BISERTE et G. SEZILLE, Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol. 11, 832-835 (1966)

- 83 - W.D. WAGNER et T.B. CLARKSON, "Arterial Mesenchyme and Arteriosclerosis" (Plenum Press, N.Y./London) (1974)
- 84 - S. WOLF et N.T. WERTHESEN, "The Smooth Muscle of the Artery" (Plenum Press, N.Y./London) (1975)
- 85 - K. FISHER-DZOGA, R. CHEN et R.W. WISSLER, dans "Arterial Mesenchyme and Arteriosclerosis" (W.D. Wagner et T.B. Clarkson eds.) pp. 299-314 (Plenum Press, N.Y./London) (1974)
- 86 - Y. STEIN, J. VANDERKOEK et O. STEIN, *Paroi Artérielle* 3, 135 (1976)
- 87 - D.W. URRY, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 68, 810-814 (1971)
- 88 - G. ABATANGELO et D. DAGA-GORDINI, *Biochim. Biophys. Acta* 342, 281-289 (1974)
- 89 - J. RENAI, N. GROULT, L. SCEBAT et J. LENEGRÉ, dans "Le Rôle de la Paroi Artérielle dans l'Athérogénèse" pp. 323-350 (CNRS, Paris) (1967)
- 90 - J. RENAI, P. HADJIISKY et L. SCEBAT, dans "Arterial Mesenchyme and Arteriosclerosis" (W.D. Wagner et T.B. Clarkson eds) pp. 335-354 (Plenum Press, N.Y./London) (1974)
- 91 - V. BEAUMONT et J.L. BEAUMONT, *Pathol. Biol.* 16, 869 (1968)
- 92 - G. MILHAUD, J.N.T. ABBOT et G. COURTOIS, *Biomédecine* 23, 223 (1975)
- 93 - B.C. SYKES et S.M. PARTRIDGE, *Biochem. J.* 130, 1171 (1972) ; 141, 567 (1974)
- 94 - M. DAVRIL et K.K. HAN, *Febs Letters* 43, 331-336 (1974)
- 95 - P.M. GALLOP et M.A. PAZ, *Physiol. Rev.* 55, 418-487 (1975)
- 96 - J.A. FOSTER, R.P. MECHAM et C. FRANZBLAU, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 72, 1399-1406 (1976)

- 97 - D.W. URRY, dans "Arterial Mesenchyme and Arteriosclerosis" (W.D. Wagner et T.B. Clarkson eds) pp. 211-246 (Plenum Press, N.Y./London) (1974)
- 98 - S.M. PARTRIDGE, dans "Biology of the Fibroblast" (E. Kulonen et J. Pikkarainen eds) pp. 13-39 (Acad. Press, London) (1973).
- 99 - S.M. PARTRIDGE, *Biochim. Biophys. Acta* 140, 132-141 (1967)
- 100 - L. GOTTE, M. MAMMI, G. PEZZIN, *Connective Tissue Res.* 1, 61 (1972)
- 101 - J. BIETH et T. KLUMPP, dans "L'alpha-1 antitrypsine et le système Pi alpha-1-antitrypsin and Pi system" pp. 181-188 (INSERM, Paris) 40 (1975)
J.F. MEYER, J. BIETH et P. METAIS, *Clin. Chim. Acta* 62, 43-53 (1975)
- 102 - J.C. ANDERSON, dans "Intern. Review of Connective Tissue Research" (D.A. Hall, ed) pp. 251-322 (Acad. Press, N.Y./London) Vol. 7 (1976)
- 103 - D.A. HALL, *Connective Tissue Res.* 4, 181 (1976)
- 104 - V.D. HOSPELHORN et M.D. FITZPATRICK, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 6, 191 (1961)

TRAVAUX DE L. ROBERT SUR
L'ÉLASTINE ET LES ÉLASTASES

1957 - 1976

- 1 - L. Robert et P. Samuel
Méthode spectrophotométrique pour le dosage de l'inhibiteur sérique de l'élastase.
Annal. Biol. Clin., 15, 453-458 (1957)
- 2 - L. Robert et P. Samuel
Mechanism of elastolysis by pancreatic elastase.
Experientia 13, 167-170 (1957)
- 3 - L. Robert et N. Poullain
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 (1963)
- 4 - L. Robert et P. Crosti
Effects of crude pancreatic elastase on serum haptoglobin.
Clin. Chim. Acta, 9, 56-63 (1964)

- 5 - F. Stein, M.P. Pezess, L. Robert et N. Poullain
Antiélastin antibodies in normal and pathological human sera.
Nature, 207, 312-313 (1965)
- 6 - N. Poullain et L. Robert
Rôle des forces hydrophobes dans la structure de l'élastine.
dans : Colloque sur la Biochimie et la Physiologie du Tissu Conjonctif
Lyon (ed. Ph. Comte) pp. 139-143 (1965)
- 7 - L. Robert et N. Poullain
Structure de l'élastine. Rôle des forces hydrophobes.
Arch. Mal. du Coeur, 59, Suppl. 3, 121-127 (1966)
- 8 - L. Robert, F. Stein, M.P. Pezess, N. Poullain
Propriétés immunochimiques de l'élastine. Leur importance dans
l'athéromatose.
Arch. Mal. du Coeur, 60, Suppl. 1, 233-241 (1967)
- 9 - P. Comte et L. Robert
Composition en amino acides de la Kappa-élastine.
Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 1349-1351 (1968)
- 10 - L. Robert, M. Robert, M. Moczar et E. Moczar
Constituants macromoléculaires de la paroi artérielle ; antigénicité
et rôle dans l'athérosclérose.
dans : "Rôle de la Paroi Artérielle dans l'Athérogénèse" (colloque
CNRS) pp. 395-424 (1968)
- 11 - N. Kornfeld-Poullain et L. Robert
Effets de différents solvants organiques sur la dégradation alcaline
de l'élastine.
Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 759-771 (1968)
- 12 - A.M. Robert, B. Robert et L. Robert
Anticorps anti-élastine et athérome
Ann. Inst. Pasteur, 115, 971 (1968)
- 12A - B. Robert et A.M. Robert
Mécanismes immunologiques dans l'athérosclérose.
Méd. et Hyg. 27, 822-824 (1969)

- 13 - B. Robert, Y. Legrand, G. Pignaud, J. Caen et L. Robert
Activité élastinolytique associée aux plaquettes sanguines.
Path. Biol., 17, 615-622 (1969)
- 14 - B. Robert et L. Robert
Determination of elastolytic activity with ^{125}I and ^{131}I -labelled
elastin.
European J. Biochem. 11, 62-67 (1969)
- 15 - A.M. Robert, B. Robert et L. Robert
Composition et biosynthèse de l'élastine. Son rôle dans l'athérosclérose.
Arch. Mal. du Coeur, 62, Suppl. N° 3, 25-43 (1969)
- 16 - M. Moczar et L. Robert
Extraction and fractionation of the media of the thoracic aorta :
isolation and characterization of structural glycoproteins.
Atherosclerosis, 11, 7-25 (1970)
- 17 - M. Moczar, E. Moczar et L. Robert
Composition of glycopeptides obtained by proteolytic digestion of the
media of porcine aorta.
Atherosclerosis, 12, 31-40 (1970)
- 18 - B. Robert et L. Robert
Studies on the structure of elastin and the mechanism of action of
elastolytic enzymes.
dans "Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix",
ed. E.A. Balazs (Academic Press) 1, 665-670 (1970)
- 19 - L. Robert, B. Robert, J. Medema et J.P.W. Houtman
Surface areas of elastin samples determined by Krypton-85 adsorption.
Biochim. Biophys. Acta, 214, 235-237 (1970)
- 20 - L. Robert
The macromolecular matrix of the arterial wall : collagen, elastin,
mucopolysaccharides.
dans : "Atherosclerosis" Proc. Second Int. Symp., ed. R.J. Jones
(Springer-Verlag) pp 59-68 (1970)

- 21 - L. Robert, B. Robert et A.M. Robert
Molecular biology of elastin as related to aging and atherosclerosis.
Exp. Geront., 5, 339-356 (1970)
- 22 - L. Robert et B. Robert
Régulation et biosynthèse des glycoprotéines de la membrane basale
et de la paroi artérielle.
dans "Journées Annuelles de Diabétologie de l'Hôtel-Dieu" (Flammarion
ed.) p. 203-216 (1970)
- 23 - B. Robert, M. Szigeti, L. Robert, Y. Legrand, G. Pignaud et J. Caen.
Release of elastolytic activity from blood platelets.
Nature, 227, 1248-1249 (1970)
- 24 - Y. Legrand, B. Robert, M. Szigeti, G. Pignaud, J. Caen et L. Robert
Etude sur une protéase élastinolytique des plaquettes sanguines humaines.
Atherosclerosis 12, 451-465 (1970)
- 25 - L. Robert, Y. Grosogeat, A.M. Robert et B. Robert
Mechanism of calcification of elastic tissue. Induction of a typical
arteriosclerotic lesion by immunization of rabbits with purified elastin.
Israel J. Med. Sci., 7, 431-432 (1971)
- 26 - B. Robert, L. Robert, Y. Legrand, G. Pignaud et J. Caen
Elastolytic protease in blood platelets.
Ser. Haemat., 4, 175-185 (1971)
- 27 - A.M. Robert, Y. Grosogeat, V. Reverdy, B. Robert et L. Robert
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 (1971)

- 28 - B. Robert, M. Szigeti, J.C. Derouette, L. Robert, H. Bouissou et M.T. Fabre.
Studies on the nature of the "microfibrillar" component of elastic fibers.
Eur. J. Biochem. 21, 507-516 (1971)
- 29 - L. Robert, B. Robert, J.P.W. Houtman et M.V. Stack
Flow calorimetry of the sorption of butanols to elastin preparations and comparison with surface areas determined by Krypton-85 adsorption.
Biochim. Biophys. Acta 251, 370-375 (1971)
- 30 - B. Robert, Y. Legrand, C. Soria, J. Caen et L. Robert
Etude sur les protéases des plaquettes sanguines humaines : purification d'une élastase.
C.R. Acad. Sci. Paris 274, 1749-1752 (1972)
- 31 - L. Robert, A.M. Robert et B. Robert
Intéraction entre lipides, lipoprotéines et macromolécules fibreuses du tissu conjonctif.
Exposés Ann. Biochimie Méd., 31, 111-144 (1972)
- 32 - M. Szigeti, G. Monnier, B. Jacotot et L. Robert
Distribution of ingested ¹⁴C-cholesterol in the macromolecular fractions of rat connective tissue.
Connective Tissue Res., 1, 145-152 (1972)
- 33 - W. Hornebeck, B. Robert et L. Robert
Etude cinétique et thermodynamique de la dispersion alcaline de l'élastine.
C.R. Acad. Sc. Paris 275, 2981-2984 (1972)
- 34 - M. Moczar, L. Robert et B. Robert
Separation and determination of cross-linking amino acids of elastin by high voltage paper electrophoresis.
Anal. Biochem. 45, 422-427 (1972)

- 35 - Y. Legrand, J. Caen, F.M. Pooyse, M.E. Rafelson, B. Robert et L. Robert
Studies on a human blood platelet protease with elastolytic activity.
Biochim. Biophys. Acta 309, 406-413 (1973)
- 36 - K.G. McCullagh, S. Derouette et L. Robert
Studies on elephant aortic elastic tissue. Part II. Amino-acid
analysis, structural glycoproteins and antigenicity.
J. Exp. Path. 18, 202 (1973)
- 37 - L. Robert, S. Junqua, A.M. Robert, M. Moczar et B. Robert
In vitro incorporation of labelled precursors in the macromolecules
of the polymeric stroma of normal and pathological arterial wall.
dans : "Biology of the Fibroblast" eds E. Kulonen et J. Pikkarainen
(Acad. Press, London/New-York) pp. 637-649 (1973)
- 38 - B. Jacotot, J.L. Beaumont, G. Monnier, M. Szigeti, B. Robert et L. Robert
Role of elastic tissue in cholesterol deposition in the arterial wall.
Nutr. Metabol. 15, 46-58 (1973)
- 39 - A. Kadar, B. Robert et L. Robert
Etude biochimique et électromicroscopique des microfibrilles du tissu
conjonctif.
Pathol. Biol. 21, 80-88 (1973)
- 40 - J. Ouzilou, A.M. Robert et L. Robert
Etude sur la composition de la paroi aortique normale et athérosclé-
reuse.
Paroi Artérielle 1, 105-116 (1973)
- 41 - Y. Courtois, J. Ouzilou, M. Moczar et L. Robert
Différenciation et morphogénèse du tissu élastique. Incorporation de
précurseurs radioactifs dans l'aorte de lapin en culture organotypique.
dans : "Différenciation des cellules eucaryotes en culture" eds. M.
Prunieras, L. Robert et C. Rosenfeld (INSERM, Paris) 19, 67-82 (1973)

- 42 - B. Robert, W. Hornebeck et L. Robert
Cinétique hétérogène de l'interaction élastine-élastase.
Biochimie 56, 239-244 (1974)
- 43 - B. Robert, J.C. Derouette et L. Robert
Mise en évidence d'une protéase à activité élastolytique dans les
extraits d'aortes humaines et animales.
C.R. Acad. Sci. Paris 278, 3251-3254 (1974)
- 44 - L. Robert, A. Kadar et B. Robert
The macromolecules of the intercellular matrix of the arterial wall :
collagen, elastin, proteoglycans and glycoproteins.
dans : "Arterial Mesenchyme and Arteriosclerosis" eds W.D. Wagner
et T.B. Clarkson (Plenum Press, N.Y.) pp 85-123 (1974)
- 45 - G.M. Turino, W. Hornebeck et B. Robert
In vivo effects of pancreatic elastase. I. Studies on the serum
inhibitors.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 146, 712-717 (1974)
- 46 - B. Robert, L. Robert et A.M. Robert
Elastine, élastase et artériosclérose
Path. Biol. 22, 661-669 (1974).
- 47 - L. Robert, M. Moczar et M. Robert
Biogenesis, maturation and aging of elastic tissue.
Experientia 30, 211-212 (1974)
- 48 - M. Claire, B. Jacotot, L. Robert et J.L. Beaumont.
Characterization of lipid classes associated with elastin isolated
from normal and pathological human aorta.
dans "Protides of the Biological Fluids" ed. H. Peeters (Pergamon
Press, Oxford/New-York) 22, 167-170 (1975)

- 49 - M. Moczar, J. Ouzilou, Y. Courtois et L. Robert
Organ culture studies on the biosynthesis of intercellular macromolecules of aorta.
dans : "Protides of the Biological Fluids" ed. H. Peeters (Pergamon Press, Oxford/New-York) 22, 157-159 (1975)
- 50 - B. Robert et L. Robert
Aortic elastase, its role in the degradation of arterial elastin.
dans : "Protides of the Biological Fluids" ed. H. Peeters (Pergamon Press, Oxford/New-York) 22, 413-418 (1975)
- 51 - Y. Legrand et B. Robert
Purification and characterization of human blood platelet elastase.
dans : "Protides of the Biological Fluids" ed. H. Peeters (Pergamon Press, Oxford/New-York) 22, 419-424 (1975)
- 52 - Y. Legrand, G. Pignaud, J.P. Caen, B. Robert et L. Robert
Separation of human blood platelet elastase and proelastase by affinity chromatography.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 63, 224-231 (1975)
- 53 - J. Ouzilou, Y. Courtois, M. Moczar et L. Robert
Biosynthèse des macromolécules de la matrice intercellulaire en culture d'organe d'aorte. Influence de l'âge de l'animal.
C.R. Acad. Sc. Paris 280, 209-212 (1975)
- 54 - W. Hornebeck et S.M. Partridge.
Conformation changes in fibrous elastin due to calcium ions.
Eur. J. Biochem. 51, 73-78 (1975)
- 55 - W. Hornebeck, J.C. Derouette et L. Robert
Isolation, purification and properties of aortic elastase.
FEBS Letters 58, 66-70 (1975)

- 56 - A. Ordinas, W. Hornebeck, L. Robert et J.P. Caen
Interaction of platelets with purified macromolecules of the arterial wall.
Path. Biol. 23, 44-48 (1975)
- 57 - W. Hornebeck et L. Robert
Isolation and properties of an aortic elastase.
dans : "Protides of the Biological Fluids" ed. H. Peeters (Pergamon Press, Oxford/New-York) 23, 205-209 (1976)
- 58 - L. Robert
Vie et mort du tissu élastique.
Gazette Méd. de France 83, N° 10, 1019-1030 (1976)
- 59 - M. Claire, B. Jacotot et L. Robert
Characterization of lipids associated with macromolecules of the intercellular matrix of human aorta.
Connective Tissue Res. 4, 61-71 (1976)
- 60 - L. Robert et W. Hornebeck
Preparation of insoluble and soluble elastins.
dans : "The Methodology of Connective Tissue Research" ed. D.A. Hall (Joyson-Bruvvers Ltd, Oxford) pp. 81-104 (1976)
- 61 - W. Hornebeck, J.C. Derouette, J. Roland, F. Chatelet, H. Bouissou et L. Robert
Corrélation entre l'âge, l'artériosclérose et l'activité élastinolytique de la paroi aortique humaine.
C.R. Acad. Sc. Paris 282, 2003-2006 (1976)
- 62 - M. Moczar, J. Ouzilou, Y. Courtois et L. Robert
Age dependence of the biosynthesis of intercellular matrix macromolecules of rabbit aorta in organ culture and cell culture.
Gerontology 22, 461-462 (1976)

- 63 - M. Moczar et L. Robert
Action of human hyperlipemic sera on the biosynthesis of intercellular matrix macromolecules in aorta organ cultures.
Paroi Artérielle 3, 105-113 (1976)
- 64 - A.M. Robert, M. Moczar, G. Godeau, R. Allard, E. Moczar, L. Robert
D. Loisançe, S. Derouette et J.P. Cachera.
Biochemical studies on dacron arterial protheses.
Pathol. Biol. 24, 42-47 (1976)
- 65 - M. Moczar, R. Allard, L. Robert, D. Loisançe, S. Derouette et
J.P. Cachera.
Biosynthesis of elastin and other matrix-macromolecules in veinous arterial prothesis.
Pathol. Biol. 24, 37-41 (1976)

THESES DIRIGÉES PAR L. ROBERT

SUR L'ELASTINE ET L'ELASTASE.

- 66 - N. Kornfeld-Poullain
Etude sur la cinétique de la dispersion alcaline de l'élastine.
Thèse d'Université Paris VI, 1968.
- 67 - W. Hornebeck
Etudes cinétiques et thermodynamiques de la dispersion de l'élastine.
Thèse de 3ème Cycle à Paris VI, 4 Mai 1973
- 68 - J.C. Derouette
Purification de l'élastase d'aorte de porc et étude comparative des méthodes de dosage des élastases.
Thèse de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes à Paris VI, 16/12/1975

- 69 - Y. Legrand
Mise en évidence, purification partielle d'une élastase plaquettaire :
son implication possible dans le phénomène d'athérosclérose.
Thèse de Doctorat d'Etat à Paris VI, 7 Juillet 1976
- 70 - W. Hornebeck
Elastine et élastases dans les tissus normaux et pathologiques.
Thèse de Doctorat d'Etat à Paris XII, 1977 en préparation.
- 71 - M. Moczar
Glycoprotéides de la trame fibreuse de la paroi artérielle.
Thèse de Docteur-Ingénieur, Univ. de Lille 18 décembre 1968

TRAVAUX SUR LES GPS DU TISSU ELASTIQUE

- 72 - L. Robert et P. Comte
Aminoacid composition of structural glycoproteins.
Life Sciences 7, 493-497 (1968)
- 73 - A.M. Robert, B. Robert et L. Robert
Chemical and physical properties of structural glycoproteins.
dans "Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix"
ed. E.A. Balazs (Acad. Press) 1, 237-242 (1970)
- 74 - L. Robert, B. Robert, E. Moczar et M. Moczar
Les glycoprotéines de structure du tissu conjonctif.
Pathol. Biol. 20, 1001-1012 (1972)

- 75 - L. Robert, S. Junqua et M. Moczar
Structural glycoproteins of the intercellular matrix.
dans "Frontiers of Matrix Biology" ed. A.M. Robert et L. Robert
"Burkitt Lymphoma, Hemostasis and Intercellular Matrix", 3, 113-142
(1976) (Karger, Basel)
- 76 - M. Moczar, E. Moczar et L. Robert
Structural glycoproteins from the media of pig aorta. Aggregation of
the carboxamidomethyl subunits.
Biochimie 59, 141-151 (1977)
- 77 - B. Robert et L. Robert
Aging of connective tissues. General considerations.
dans "Frontiers of Matrix Biology" vol. 1 "Aging of Connective Tissues,
Skin" eds L. Robert et B. Robert (Karger, Basel) pp. 1-45 (1973)
- 78 - L. Robert
Membranes and aging.
dans "Mammalian Cell Membranes" ed. G.A. Jamieson et D.M. Robinson
(Butterworths, London) 5, 220-259 (1977)

TRAVAUX SOUS PRESSE OU RECEMMENT PARUS

- 79 - W. Hornebeck, J.C. Derouette, D. Brechemier, J.J. Adnet et L. Robert
Elastogenesis and elastolytic activity in human breast cancer.
Biomédecine 26, 48-51 (1977)
- 80 - L. Robert, D. Brechemier, G. Godeau, M.L. Labat et G. Milhaud
Prevention of experimental immun arteriosclerosis by calcitonin.
Biochem. Pharmacol. (1977) sous presse.