



HAL
open science

Le vieillissement artériel dans un modèle de vieillissement physiologique et un modèle de vieillissement accéléré, le diabète: aspect fonctionnel et morphologique. Intérêt respectif de l'aspirine et de l'aminoguanidine

Helene Bulckaen

► **To cite this version:**

Helene Bulckaen. Le vieillissement artériel dans un modèle de vieillissement physiologique et un modèle de vieillissement accéléré, le diabète: aspect fonctionnel et morphologique. Intérêt respectif de l'aspirine et de l'aminoguanidine. Sciences du Vivant [q-bio]. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2009. Français. NNT: . tel-00423311

HAL Id: tel-00423311

<https://theses.hal.science/tel-00423311>

Submitted on 9 Oct 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Lille II

Faculté de médecine

Année 2009

N° _____

THESE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR de L'UNIVERSITE de LILLE II

Discipline : Pharmacologie fondamentale - pharmacologie clinique (Médecine)

Présentée par

Hélène BULCKAEN WOESTELANDT

**LE VIEILLISSEMENT ARTERIEL DANS UN MODELE DE VIEILLISSEMENT
PHYSIOLOGIQUE ET UN MODELE DE VIEILLISSEMENT ACCELERE, LE DIABETE:
ASPECT FONCTIONNEL ET MORPHOLOGIQUE
INTERET RESPECTIF DE L'ASPIRINE ET DE L'AMINO GUANIDINE**

Directeur de Thèse : François Puisieux

Soutenue le 29 juin 2009

JURY

Monsieur le Professeur Olivier Hanon	Rapporteur
Monsieur le Professeur Jacques Tréton	Rapporteur
Monsieur le Professeur Bruno Corman	Examineur
Monsieur le Professeur Pirouz Shirali	Examineur
Monsieur le Professeur François Puisieux	Directeur de thèse

Je remercie pour l'honneur qu'ils me font :

Monsieur le professeur Olivier Hanon

Monsieur le Professeur Jacques Tréton

en acceptant d'être les rapporteurs de cette thèse

Monsieur le Professeur Bruno Corman

Monsieur le Pirouz Shirali

Monsieur le Professeur François Puisieux, mon directeur de thèse

en acceptant de juger ce travail

Je tiens à remercier Monsieur le docteur Eric Boulanger pour ses compétences, sa disponibilité et son aide précieuse.

Je tiens à remercier également le Professeur Bordet pour son accueil au sein du laboratoire de pharmacologie.

J'exprime ma gratitude à madame le Professeur Creusy, au Professeur Gosset, à Laurence Fleurisse et Ilaria Bernardini pour le travail accompli en histologie.

Je remercie le Professeur Shirali et le Docteur Garçon pour leur précieuse collaboration, leurs compétences, leur accueil et leur soutien. Je leur exprime mon profond respect.

Je remercie également le professeur Corman pour son aide et son soutien.

Je souhaite remercier le Professeur Wautier et madame le Docteur Wautier pour leur collaboration.

Aux collègues qui ont participé à ce projet, Gaétan Prévost, Géraldine Robitaille, Valérie Roquet, Cédric Gaxatte et Guillaume Béraud, merci pour le travail accompli.

A toute l'équipe de pharmacologie, Olivier et Maud Pétrault, Patrick Gélé, Tavarak Ouk, Sophie Gautier, merci pour vos conseils, votre disponibilité et votre bonne humeur.

A tous ceux présents et passés, qui, dans les moments faciles mais aussi difficiles m'ont aidée, m'ont permis de devenir ce que je suis et me permettent de progresser.

Pour Emmanuel, Chloé, Léo, Lou et Jade, pour votre tolérance, votre amour, pour ce que vous êtes.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	1
1. Introduction	2
2. Les artères	6
3. Les propriétés de l'endothélium	7
3.1. Barrière semi-perméable	8
3.2. Action anti-thrombogène	9
3.3. Vasorégulation	9
3.3.1. Les facteurs endothéliaux vasorelaxants	10
3.3.1.a. Le monoxyde d'azote	11
3.3.1.b. La prostacycline	13
3.3.1.c. Les substances hyperpolarisantes dépendantes de l'endothélium	14
3.3.2. Les facteurs endothéliaux contractants	15
3.3.2.a. L'endothéline	15
3.3.2.b. Les autres facteurs de contraction dérivés de l'endothélium	15
4. La dysfonction endothéliale	16
4.1. Définition	16
4.2. Dysfonction endothéliale : pertinence clinique	17
4.3. Altérations de la relaxation endothélium-dépendante : méthodes d'étude	18
PREMIERE PARTIE : Le vieillissement artériel lié à l'âge	21
1. La structure du vaisseau et vieillissement artériel lié à l'âge	22
2. La dysfonction endothéliale au cours du vieillissement artériel lié à l'âge	22
2.1. Caractéristiques	23

2.2. Molécules d'adhésion et vieillissement artériel physiologique	24
2.3. Mécanismes de l'altération de la relaxation endothélium-dépendant	24
2.3.1. Nombre et sensibilité des récepteurs agonistes endothéliaux	25
2.3.2. Réponse de la cellule musculaire lisse aux agents vasorelaxants	25
2.3.2.a. La voie du NO	26
2.3.2.b. La voie des cyclooxygénases	29
3.3. Dysfonction endothéliale liée à l'âge, un phénomène réversible ?	29
3.3.1. Supplémentation en arginine et donneurs de NO	29
3.3.2. Augmentation de la biodisponibilité de NO	30
3.3.2.a. Tétrahydrobioptérine	30
3.3.2.b. Anti-oxydant	30
3.3.2.c. Inhibiteur de la HMG-CoA réductase.	31
3.3.2.d. Inhibiteur de l'enzyme de conversion	31
3.3.2.e. Activité physique	31
4. L'aspirine	31
4.1. Aspirine et maladies vasculaires	32
4.2. Aspirine, mode d'action dans la prévention des maladies vasculaires	33
5. Objectif de notre travail	34
6. Matériels et méthodes	35
6.1. Animaux	35
6.2. Protocoles	36
6.3. Vasoréactivité aortique	38
6.3.1. Prélèvements	38
6.3.2. Préparation des anneaux aortiques	38
6.3.3. Installation des anneaux	38
6.3.4. Protocole d'étude de la vasoréactivité	39
6.4. Etude anatomopathologique de l'aorte	41
6.4.1. Prélèvements	41
6.4.2. Coupes	41
6.4.3. Etude morphométrique	42
6.4.4. Colorations standards et histochimiques	42

6.4.5. Techniques immunohistochimiques	43
6.4.5.a. Principe général	43
6.4.5.b. Anti actine lisse	44
6.4.5.c. Anticorps Anti Proliferating Cell Nuclear Antigen	44
6.4.5.d. Anticorps anti AGEs	45
6.4.5.e. Anticorps anti Vascular Cell Adhesion Molecule 1	45
6.4.6. Analyse en Western-Blot de l' expression de RAGE et VCAM-1	46
6.5. Etude du stress oxydant	47
6.5.1. Prélèvements	47
6.5.2. Détermination des concentrations de malondialdéhyde MDA	48
6.5.3. Détermination de l'activité SOD	48
6.5.4. Détermination des concentrations de 8-OhdG	48
6.5.5. Détermination du status en glutathion	49
6.5.6. Détermination des concentrations de TNF- α	49
6.5.7. Détermination des concentrations de NO	49
6.5.8. Détermination de la concentration protéique tissulaire	49
6.6. Dosages biologiques	50
6.6.1. Dosages plasmatiques des AGEs	50
6.6.2. Dosage de la glycémie	50
6.6.3. Dosage du cholestérol	50
6.7. Etude de l'expression génique du cytochrome cyp 2e1	51
6.8. Analyse statistique	51
7. Résultats	52
7.1. Article : Low-dose aspirin prevents age-related endothelial dysfunction in a mouse model of physiological aging	52
7.2. Etude histomorphométrique	52
7.2.1. Effets de l'âge	52
7.2.1.a. Etude morphométrique	52
7.2.1.b. Colorations standards et histochimiques	53
7.2.1.c. Etude immuno-histochimique	55
7.2.2. Effet de l'aspirine à faible dose	62
7.2.2.a. Groupe «No Asp»	62
7.2.2.b. Groupe « Asp »	64

7.3. Vasoréactivité aortique	65
7.4. Dosage des AGEs circulants	66
7.5. Expression protéique de RAGE et VCAM-1	66
7.6. Marqueurs du stress oxydant	67
8. Discussion	70
DEUXIEME PARTIE : Le vieillissement artériel dans le diabète	81
1. Dysfonction endothéliale dans le diabète	82
1.1. Anomalies de la relaxation endothélium-dépendante	82
1.1.1. Chez l'homme	82
1.1.2. Dans les modèles expérimentaux	83
1.1.3. Mécanismes impliqués dans l'altération de la relaxation endothélium-dépendante	83
1.1.3.a. Les voies de transduction du signal	84
1.1.3.b. La biodisponibilité du substrat	84
1.1.3.c. La biodisponibilité du NO	84
1.1.3.d. La sensibilité de la cellule musculaire lisse au NO	84
1.1.3.e. L'EDHF	85
1.1.3.f. Les facteurs contractants	85
1.2. Protagonistes de la dysfonction endothéliale dans le diabète	85
1.2.1. L'hyperglycémie	86
1.2.2. Le stress oxydant	86
1.2.3. L'aldose réductase	88
1.2.4. La protéine kinase C	88
1.2.5. Poly(ADP-ribose) polymérase	88
1.3. Intéraction AGE-RAGE	89
2. Objectifs de notre travail	93
3 Matériel et méthodes	94
3.1. Animaux	94

3.2. Protocoles	94
3.3. Vasoéactivité aortique	95
3.3.1. Prélèvements	95
3.3.2. Préparation des anneaux aortiques	96
3.3.3. Installation des anneaux	96
3.3.4. Protocole d'étude de la vasoréactivité	96
3.4. Etude anatomopathologique de l'aorte	97
3.4.1 Coupes	97
3.4.2 Colorations standards et histochimiques	97
3.4.3 Techniques immunohistochimiques	98
3.5. Dosages plasmatiques des AGEs	98
3.6. Analyse en Western-Blot de l' expression de RAGE	98
3.7. Analyse statistique	100
4. Résultats	100
4.1 Article : Endothelium-dependent vasodilatation impairment is linked to AGEs and RAGE expression in diabetic mice: beneficial effect of aminoguanidine	100
4.2 Etude histomorphologique	100
5. Discussion	109
CONCLUSION GENERALE	113
REFERENCES	117

Abréviations

Ach	Acétylcholine	H ₂ O ₂	Péroxyde d'hydrogène
ADMA	<i>Asymmetric dimethyl arginine</i>	HPLC	Chromatographie liquide haute performance
ADP	Adénosine diphosphate	ICAM	<i>Intercellular cell adhesion molecules</i>
AG	Aminoguanidine	IDM	Infarctus du myocade
AGE	<i>Advanced Glycation Endproducts</i>	IGF1	<i>Insulin Growth factor 1</i>
ATP	Adénosine triphosphate	IL	Interleukine
AVC	Accident vasculaire cérébral	IP ₃	Inositol tri-phosphates
CML	Carboxyméthyllysine	L-NA	NG-nitro-L-arginine
COX	Cyclooxygénase	L-NAME	NG-nitro-L-arginine ester méthylique
cyp 2e1	Cytochrome p450 2E1	L-NMA	NG-monométhyl-L-arginine
BH4	Tétrahydrobioptérine	MDA	Malondialdehyde
DAG	Diacylglycérol	MLC20	Chaîne légère de la myosine (20 kDa)
DT1	Diabète de type 1	MLCK	<i>Myosin light chain kinase</i>
DT2	Diabète de type 2	MLCP	<i>Myosin light chain phosphatase</i>
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine I	MPP	Métalloprotéase
ECE	Enzyme de conversion des endothélines	NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
EDCF	<i>Endothelium-derived contracting factor</i>	NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
EDHF	<i>Endothelium-derived hyperpolarizing factor</i>	NO	Monoxyde d'azote
EDRF	<i>Endothelium-derived relaxing factor</i>	NOS	NO synthétase
eNOS	Endothélium NO synthétase	O ₂ ^{•-}	Anion superoxyde
esRAGE	<i>endogenous soluble RAGE</i>	8OhdG	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine
ET	Endothéline	^o OH	Radical hydroxyle
ET _A et ET _B	récepteurs à endothéline	ONOO ⁻	Péroxynitrite
GMPC	Guanosine monophosphate cyclique	PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor 1
GSH	Glutathion réduit	PARP	Poly ADP-ribose polymérase

GSSG	Glutathion disulfide oxydé		
PCNA	Anticorps Anti Prolifering Cell Nuclear Antigen	RNS	Reactive nitric species
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	RT-PCR	<i>Real-time reverse transcription-polymerase-chain reaction</i>
PDGF	Platelet Derived Growth Factor	SNP	Nitroprussiate de sodium
PGH ₂	Prostaglandines	SOCs	<i>Store-operated channels</i>
PGI ₂	Prostacyclines	SOD	Superoxyde dismutase
Phe	Phényléphrine	TGFβ	<i>transforming growth factorβ</i>
PKC, PKA	Protéine kinase C, A	TNFα	<i>tumor necrosis factor α</i>
RAGE	<i>Receptor for Advanced Glycation Endproducts</i>	VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecules</i>
RL	Resting level	VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
ROS	Reactive oxygen species		

Table des illustrations

Introduction générale

Figure 1. Structure de l'artère	7
Figure 2. Synthèse et rôle du NO	13
Figure 3. Voies de contraction	16

Le vieillissement artériel lié à l'âge

Figure 4. Mécanismes de diminution de la biodisponibilité du NO	28
Figure 5. Design de l'étude	37
Figure 6. Schéma d'une chambre d'organe isolé	40
Figure 7. Mode d'action de l'acétylcholine	40
Tableau 1. Epaisseur intima-media en fonction du segment de l'aorte et de l'âge des animaux	53
Figures 8 à 16. Colorations standards et immunohistochimiques	57 à 59
Tableau 2. Nombre et type de cellules marquées par l'anticorps antiPCNA	60
Tableau 3. Récapitulatif des modifications histologiques	62
Tableau 4. Résultats du comptage de nombre total de cellules et du nombre de cellules marquées au PCNA	65
Tableau 5. Dosage des AGEs plasmatiques	66
Figure 17. Analyse en Western Blot de l'expression protéique de RAGE et VCAM-1	66
Tableau 6. Comparaison des dosages des marqueurs du stress oxydant dans les groupes semaines et « No Asp »	68
Tableau 7. Comparaison de dosages des marqueurs du stress oxydant dans les groupes « Asp » et « No Asp »	69

Le vieillissement artériel lié au diabète

Figure 18. Interactions des AGEs avec les éléments sanguins	90
Figure 19. Design de l'étude	95
Figure 20 à 25. Colorations standards et immunohistochimiques	102 à 105
Figure 26. Epaisseur intima-média de l'aorte	107
Tableau 8. Récapitulatif des données de vasomotricité et d'histomorphologie	108

RESUME

Les modifications artérielles liés au vieillissement ou au diabète telles que la dysfonction endothéliale contribuent à augmenter le risque de survenue d'événements cardiovasculaires. La dysfonction endothéliale, coronaire ou périphérique, est reconnue comme un facteur indépendant de survenue d'événements cardiovasculaires indépendamment de la présence d'athérosclérose ou de facteur de risque d'athérosclérose. Des approches thérapeutiques capables de prévenir ou de restaurer la dysfonction endothéliale pourrait aider à réduire le risque de survenue d'accidents cardiovasculaires.

Ce travail a pour but d'évaluer les effets de deux molécules, l'une sur la dysfonction endothéliale liée à l'âge, l'autre sur la dysfonction liée au diabète.

En prévention primaire et secondaire, l'aspirine à faible dose réduit l'incidence des événements cardiovasculaires. La première partie de ce travail étudie les effets de l'aspirine à faible dose sur la dysfonction endothéliale chez des souris C57B/J6. La dysfonction endothéliale liée à l'âge est établie par la réponse à l'acétylcholine (ACh) de segments aortiques précontractés par phényléphrine (Phe) et isolés de souris âgées de 12-, 36-, 60- et 84 semaines. Les effets de l'aspirine à faible dose sont étudiés chez des souris présentant une altération de la relaxation endothélium-dépendante. Les effets de l'âge et du traitement par aspirine sur la structure de la paroi ont été déterminés sur des coupes aortiques de souris. Les effets de l'aspirine sur des marqueurs du stress oxydants, le malondialdéhyde (MDA) et l'8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) ont été étudiés.

Comparée à celle des souris âgées de 12 semaines, la relaxation endothélium-dépendante était significativement réduite chez les souris âgées de 60- et 84-semaines ($p < 0.05$). Les souris âgées de 68 semaines traitées par aspirine avaient une meilleure relaxation endothélium-dépendante comparées aux souris contrôles du même âge ($83.9\% \pm 4$ vs $66.3\% \pm 5$; $p < 0.05$). L'aspirine à faible dose diminuait les concentrations de 8-OHdG au sein de la paroi aortique ($p < 0.05$), mais n'avait pas d'effet significatif sur l'épaisseur intima-média. L'effet protecteur de l'aspirine n'a pas été observé lorsque le traitement a été initié chez des souris plus âgées (96 semaines).

L'aspirine à faible dose est capable de prévenir la dysfonction endothélium-dépendante chez des souris vieillissantes. Cependant l'absence d'effet chez des souris plus âgées montre que le traitement doit être initié tôt. Les mécanismes impliqués dans l'effet protecteur de l'aspirine à faible dose pourrait être le stress oxydant.

Les AGE sont impliqués dans la dysfonction endothéliale notamment liée au diabète, via des phénomènes de quenching du NO et d'interaction AGE-RAGE, cette dernière entraînant une augmentation du stress oxydant. La deuxième partie de notre travail analyse l'action de l'aminoguanidine, puissant inhibiteur des AGE sur la dysfonction endothéliale liée au diabète. La dysfonction endothéliale de souris C57B/6J rendues diabétiques par injection de streptozotocine, est établie par la réponse à l'acétylcholine (ACh) de segments aortiques précontractés par phényléphrine (Phe) et isolés de souris après 4 et 8 semaines de diabète. Des dosages d'AGE sériques par technique ELISA et une évaluation de l'expression de RAGE par technique de western blot ont été réalisés sur des broyats aortiques.

Après 4 semaines de diabète, comparée à celle des contrôles, la relaxation endothélium dépendante était diminuée de 24% ($p < 0,01$) et s'altérait encore après 8 semaines de diabète. Cette dysfonction endothéliale était associée à une augmentation significative des AGE sériques, de l'expression de RAGE et à des anomalies histologiques significatives.

Le traitement par aminoguanidine permettait d'une part de prévenir les anomalies de relaxation endothelium dépendante observées chez les souris diabétiques de 4 semaines, réduisait les AGE sériques et l'expression de RAGE et d'autre part améliorait les anomalies histologiques vasculaires.

Ces résultats suggèrent une implication de la voie des AGE dans la dysfonction endothéliale liées au diabète. L'utilisation de molécules anti AGE ou inhibiteurs de l'interaction AGE-RAGE ouvre de larges perspectives thérapeutiques du diabète.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats suggèrent la possibilité de prévention de la dysfonction endothéliale et ainsi laisse espérer la diminution de survenue d'évènements cardiovasculaires.

INTRODUCTION GENERALE

1. INTRODUCTION

Les maladies cardio- et cérébrovasculaires sont les principales causes de morbi-mortalité dans les pays industrialisés. La France est, comme les autres pays développés, concernée par ces maladies vasculaires. Après une majoration de l'incidence de ces pathologies entre 1930 et 1965; un relatif déclin s'installe depuis les trente dernières années. C'est probablement la conséquence heureuse d'une meilleure prise en charge dans la population générale des principaux facteurs de risque des maladies vasculaires et l'efficacité d'autres outils de prévention comme les anti-agrégants plaquettaires, les anticoagulants ou encore l'endartériectomie. Les maladies vasculaires restent néanmoins le premier motif d'hospitalisation avec 11,5% des hospitalisations mais aussi la première cause de mortalité avec 32% des décès soit 180000 décès par an (**Haut Comité de Santé Publique, 2004**). L'Institut de Recherche et Documentation en Economie de Santé rapporte que les maladies cardiovasculaires représentent le poste le plus important (12,6 %) de la consommation de soins et de biens médicaux, soit 13,6 milliards d'euros sur un total de 107,6 milliards d'euros de soins hors prévention (**Bulletin d'Information en Economie de la Santé, 2006**). Les maladies vasculaires sont donc un problème de santé publique. Elles le resteront dans les années à venir. En effet, l'incidence de ces maladies augmentant avec l'âge et la population des pays industrialisés vieillissant rapidement, il faut s'attendre à une augmentation du nombre de ces pathologies, l'effet du vieillissement de la population compensant le bénéfice apporté par les mesures de prévention. Des études prospectives récentes conduisent à placer la mortalité par maladies cardiaques ischémiques comme première cause de mortalité dans le monde en l'an 2020 (**Murray et Lopez, 1997**).

Les maladies vasculaires sont le plus souvent la conséquence de l'athérosclérose. L'hypercholestérolémie, le diabète, l'hypertension, le tabac sont des facteurs de risque bien établis d'athérosclérose et donc de survenue de maladies vasculaires. La dysfonction endothéliale, coronaire ou périphérique, est également reconnue comme un facteur indépendant de survenue d'évènements vasculaires chez les patients présentant une athérosclérose et ce quels que soient les stades de l'athérosclérose. (**Gokce et coll., 2002 ; Perticone et coll., 2001 ; Schachinger et coll., 2000 ; Suwaidi J et coll., 2000**). Plus récemment, même en l'absence d'athérosclérose, il a été démontré que la dysfonction endothéliale était un facteur indépendant de survenue d'accident vasculaire. Ainsi, Targonsli

et coll ont montré que la présence d'une dysfonction endothéliale coronaire en l'absence de cardiopathie ischémique obstructive était le facteur de risque le plus important de survenue d'accident vasculaire cérébral ischémique chez des sujets d'âge moyen, après une médiane de suivi de 16 mois, avec un risque relatif de survenue d'AVC (**Targonsli et coll., 2003**). D'autres études ont confirmé que la dysfonction endothéliale est un facteur capital, systémique et pronostique dans le risque de survenue d'accidents vasculaires (**Gokce et coll., 2002; Rodriguez-Martinez et coll., 1998 ; Taddei et coll., 2006 ; Targonski et coll., 2003**). La présence d'une dysfonction endothéliale chez des patients âgés de 45 à 66 ans, indemnes de pathologies ou de facteurs de risque cardiovasculaires est retrouvée comme facteur de survenue de progression de l'épaisseur intima-média carotidienne (**Halcox JP, 2009**).

L'endothélium joue un rôle clé dans la régulation des propriétés de l'artère. Il possède plusieurs propriétés : des propriétés antithrombotiques et antiadhésives, des propriétés de régulation de la perméabilité vasculaire, de la prolifération des cellules musculaires et de la dilatation vasculaire. Des anomalies de ces principales fonctions endothéliales sont regroupées sous le terme de dysfonction endothéliale. Néanmoins, dans la littérature, le terme de dysfonction endothéliale sous-entend principalement une anomalie de la fonction vasodilatatrice de l'endothélium encore appelée altération de la relaxation endothélium-dépendante (**Matz et Andriantsitohaina, 2003**).

La dysfonction endothéliale est associée à tous les facteurs de risque vasculaire (**Ross, 1999**). Ainsi la dysfonction endothéliale est décrite au cours du diabète. La diminution de la vasorelaxation endothélium-dépendante est largement décrite dans des modèles expérimentaux de diabète chimiquement induits par la streptozotocine ou l'allotane et des modèles génétiques de diabète insulino-dépendant (**De Vriese et coll., 2000 ; Lindsay et coll., 1997**). Dans les modèles animaux génétiques de diabète de type 2, les résultats sont plus nuancés. (**Bohlen et coll., 1995 ; Sakamoto et coll., 1998 ; Molnar et coll., 2005**). La dysfonction endothéliale est décrite chez le patient diabétique avec ou sans complication vasculaire (**Saenz de Tejada et coll., 1989 ; Khan et coll., 1996 ; Nittenberg et coll. 1993**) même si les résultats obtenus dans la population diabétique de type 2 sont d'interprétation parfois difficile dans la mesure où il existe chez le même patient souvent d'autres facteurs de risque vasculaire qui affectent également la fonction endothéliale.

Le vieillissement physiologique par lui-même s'accompagne d'une dysfonction endothéliale. Ceci a été démontré chez l'animal en particulier le rat et ce dans plusieurs territoires artériels (**Matz et Andriantsitohaina, 2003**). Chez l'homme âgé, la dysfonction endothéliale existe,

mais il est plus difficile d'isoler le facteur vieillissement en raison de la coexistence très fréquente de pathologies ou facteurs de risque pouvant eux-même engendrer une dysfonction endothéliale.

La dysfonction endothéliale retrouvée au cours du vieillissement et du diabète résulte sans doute de plusieurs mécanismes : augmentation de facteurs contractants, anomalie de nombre ou d'affinité de leurs récepteurs sur les cellules endothéliales, altération de la réponse des cellules musculaires lisses aux substances vasodilatatrices dérivées de l'endothélium, anomalie de production et/ou de biodisponibilité des substances vasodilatatrices synthétisées par l'endothélium. La principale substance vasodilatatrice synthétisée par l'endothélium est le monoxyde d'azote (NO). Le stress oxydant joue probablement un rôle majeur dans la survenue de la dysfonction endothéliale tant au cours du vieillissement physiologique qu'au cours du diabète notamment en diminuant la biodisponibilité du NO (**Hattori et coll., 1991 ; Matz et Andriantsitohaina, 2003 ; Pieper et coll., 1996 ; Tesfamarian et Cohen, 1992**).

Deux populations sont particulièrement concernées par les accidents vasculaires : la population âgée et la population diabétique. La population âgée est en nombre croissant, notamment dans les pays industrialisés. Si les plus de 60 ans représentent actuellement 20% de la population française, ils représenteront 35% de la population totale en 2050, soit plus de 20 millions des personnes (INSEE 2006).

En ce qui concerne le diabète, la découverte de l'insuline par Frédéric Banting et Charles Best en 1921, avait permis de penser que le problème de cette pathologie était résolu. Malheureusement, même si l'insuline a constitué une révolution pour les patients diabétiques, il est clairement apparu durant les décennies suivantes que le diabète au long cours était associé à de sévères complications. Parallèlement, l'incidence du diabète de type 2 n'a cessé d'augmenter avec une croissance encore plus marquée au cours de ces 20 dernières années qui devrait perdurer encore pendant 20 à 30 ans. La population diabétique estimée en 2004 à 170 millions de par le monde devrait atteindre 366 millions en 2030 soit 6% de la population (**Wild et coll., 2004**). En conséquence, la problématique du diabète reste à ce jour éminemment préoccupante en dépit des vastes progrès observés dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques et dans la prise en charge de la maladie.

Le patient diabétique est confronté à une réduction de l'espérance de vie et de la qualité de vie essentiellement en raison des complications vasculaires. 75% de la mortalité dans la population diabétique est liée aux complications vasculaires (**Morrish et coll., 1990**). Le risque de mortalité vasculaire est largement augmenté dans la population diabétique: multiplié

par 3,5 chez la femme diabétique, multiplié par 2 chez l'homme diabétique versus respectivement la femme et l'homme non diabétiques (**Huxley et coll., 2006**).

Face à cette problématique clinique, nous avons choisi d'étudier deux modèles de vieillissement artériel, l'un lié à l'âge, le deuxième au diabète.

L'objet de ce travail est d'étudier le vieillissement artériel lié à l'âge et le vieillissement induit par le diabète sur le plan fonctionnel et morphologique, puis au regard de la littérature, d'étudier dans chacun des modèles une substance susceptible d'agir sur la fonction endothéliale: l'aspirine a été choisi pour le modèle de vieillissement physiologique, l'aminoguanidine a été retenue pour le modèle de diabète.

Ce travail repose sur une logique globale centrée sur le vieillissement vasculaire. Il résulte des collaborations locales et nationales, des circonstances et des opportunités de recherche au sein du CHRU de Lille. Notre étude a été menée conjointement avec l'équipe de diabétologie (Pr Fontaine, Dr Prévost) qui travaille sur l'implication des récepteurs des produits finaux de la glycation dans les complications du diabète. Ainsi, notre travail a débuté dans le laboratoire de pharmacologie (Pr R Bordet) par l'évaluation de la fonction endothéliale via une technique de vasoréactivité artérielle chez la souris. L'analyse histomorphologique des vaisseaux a été effectuée en collaboration avec le Pr C. Creuzy (laboratoire d'Anatomo-Pathologie, Groupement Hospitalier de l'Institut Catholique de Lille). Une collaboration a été établie avec le Pr Wautier (laboratoire de biologie Vasculaire et cellulaire, Hôpital Lariboisière, PARIS) et ses collaborateurs (Madame le Dr Wautier, Dr E. Boulanger) pour l'étude des produits finaux de la glycation (*Advanced Glycation Endproducts*=AGEs) et de leur récepteur (*Receptor for Advanced Glycation Endproducts* =RAGEs). Enfin, l'étude du stress oxydant a été réalisée grâce à la collaboration avec le Pr Shirali et le Dr Garçon (laboratoire de toxicologie de l'industrie et de l'environnement, Université du Littoral, Dunkerque).

Avant d'exposer et de discuter nos travaux personnels, ce manuscrit comporte l'analyse de la littérature sur l'endothélium, ses fonctions et sa dysfonction.

2. LES ARTERES

La paroi des vaisseaux artériels est formée de trois tuniques morphologiquement distinctes, de la lumière vers l'extérieur du vaisseau : tunique interne ou intima, tunique moyenne ou média et tunique externe ou adventice (Figure 1). L'intima est principalement constituée d'une monocouche de cellules endothéliales appelée endothélium pavimenteux simple qui est en contact avec le sang, d'une fine couche de tissu conjonctif, la membrane basale et d'une couche de tissu élastique appelée limitante élastique interne. La média contient des cellules musculaires lisses et une matrice extracellulaire faite de fibres élastiques et de collagène. Elle constitue la couche la plus épaisse et confère aux artères deux propriétés importantes : l'élasticité et la contractilité. L'adventice est composée de collagène, fibroblastes et d'éléments lymphatiques et nerveux.

Les grosses artères sont désignées sous le nom d'artères élastiques ou conductrices parce qu'elles se dilatent pour laisser passer un volume accru de sang au moment de l'éjection ventriculaire. La rétraction élastique consécutive à cette déformation pousse le sang plus en avant. Ces artères fonctionnent comme un réservoir de pression. Ce type d'artères élastiques comprend entre autres : l'aorte, le tronc brachio-céphalique, la carotide commune, la sous-clavière, l'iliaque commune. La paroi de ces artères élastiques est relativement mince par rapport à leur diamètre, et leur tunique moyenne contient plus de fibres élastiques que de cellules musculaires lisses.

Les artères moyennes sont appelées artères musculaires ou distributrices. Leur tunique moyenne contient de nombreuses cellules musculaires lisses et peu de fibres élastiques. Les artères musculaires les plus petites possèdent des propriétés d'autorégulation et sont appelées artères de résistance. Les artères cérébrales présentent avec les artères brachiales mésentériques et coronaires ce type de structure, et possèdent une plus grande capacité de vasoconstriction et de vasodilatation pour régler le volume de sang convenant aux besoins de la structure irriguée. La paroi des artères musculaires est relativement épaisse par rapport à leur diamètre, principalement à cause de la quantité importante de muscle lisse. Ces artères subissent davantage les contraintes physiques du flux sanguin en raison de leur moindre élasticité.

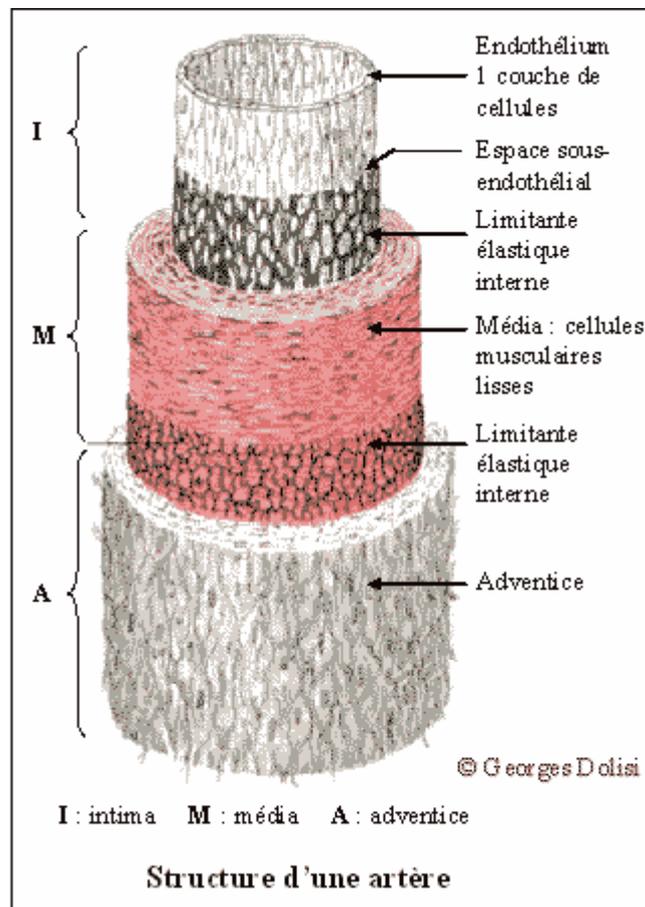


Figure 1. Structure de l'artère
Georges Dolidi, Bio-Top

3. LES PROPRIETES DE L'ENDOTHELIUM

L'endothélium est un élément fondamental de la paroi artérielle. A côté de ses caractéristiques quantitatives, poids de 1 kg, comprenant 1 à 6×10^{13} cellules, et couvrant une superficie de 1 à 7 m², l'endothélium est un organe dynamique, disséminé, aux nombreuses fonctions. Le rôle de l'endothélium dépasse celui d'une simple barrière physique entre la lumière vasculaire et le sous-endothélium. Constitué d'un endothélium pavimenteux simple qui tapisse la face

luminale de tous les vaisseaux, il joue un rôle obligatoire et déterminant dans le contrôle du tonus vasculaire (**Furchgott et coll., 1980**). De plus, l'endothélium vasculaire contribue de façon active à d'autres fonctions physiologiques: perméabilité vasculaire, fonctions immunologiques, prolifération cellulaire, maintien d'un état anti-thrombogène, agrégation plaquettaire, capacités d'interactions plaquettes-endothélium ou leucocytes-endothélium (**Fishman, 1982**).

Dans des conditions physiologiques, les facteurs hémodynamiques, pression sanguine et flux sanguin, sont les principaux éléments qui vont influencer les fonctions de l'endothélium. Les effets de ces facteurs hémodynamiques vont être détectés directement par l'endothélium, comme un stimulus physique ou en association avec des modifications locales de concentrations de facteurs chimiques, neurotransmetteurs ou hormones. Les principaux stimuli chimiques sont l'acétylcholine, l'adrénaline et la noradrénaline, la vasopressine, la bradykinine et la thrombine ou de produits dérivés des plaquettes tels la sérotonine, l'adénosine di- et tri- phosphate (ADP, ATP). Les agonistes activent la cellule endothéliale en se liant au récepteur de la protéine G membranaire des cellules endothéliales. L'activation des cellules endothéliales par les stimuli physiques ou chimiques aboutit à l'augmentation intracellulaire de Ca^{2+} . La réponse endothéliale peut être aiguë en réponse aux différents stimuli ou prolongée impliquant des modifications de l'expression de gènes impliqués dans la structure et la régulation fonctionnelle de la paroi vasculaire (**Colden-Stanfield et coll., 1987; Danthuluri et coll., 1988; Vanhoutte., 1989; Yokokawa et coll., 1990**).

3.1. Barrière semi-perméable

La première fonction de l'endothélium est mécanique, formant une barrière semi-perméable entre les éléments circulants du sang et la paroi du vaisseau sanguin assurant ainsi une fonction de perméabilité. Ainsi l'albumine et d'autres macromolécules sont transportées à travers l'endothélium vers l'interstitium. Des vésicules, canaux et/ou protéines transporteuses sont impliquées dans cette fonction de perméabilité (**Ogawa et coll., 2001; Minshall et coll., 2002 ; Simionescu et coll., 2002**).

La perméabilité vasculaire est également régulée par un équilibre de forces entre les cellules endothéliales qui adhèrent les unes aux autres. Certaines conditions, infection virale, synthèse de cytokines inflammatoires, thrombine, peuvent modifier les jonctions cellulaires

endothéliales, conduisant à une augmentation de la perméabilité cellulaire (**Bogatcheva et coll., 2002; Pries et coll., 2000**).

La cellule endothéliale synthétise et exprime à sa surface des molécules d'adhésion qui orchestrent le trafic des cellules sanguines, notamment des leucocytes. Le « rolling » des leucocytes est médié par les sélectines, l'adhésion et la migration à travers les cellules endothéliales par intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) (**Patel et coll., 2002 ; Toborek et Kaiser, 1999**). Ce phénomène existe dans des conditions physiologiques mais s'accroît lors de processus pathologiques notamment l'inflammation permettant d'accélérer la migration des leucocytes vers le site d'inflammatoire.

3.2. Action antithrombogène

Une autre fonction majeure de l'endothélium est le maintien d'une interface sang-tissu non thrombogène. L'action antithrombogène de l'endothélium s'effectue à plusieurs niveaux de l'hémostase. La diminution de l'activation plaquettaire se fait par la synthèse et le relargage par les cellules endothéliales de platelet-activating factor, de NO et de PGI₂ (**Becker et coll., 2000; Pearson, 1999**). Les cellules endothéliales synthétisent la thrombomoduline qui, en se liant à la thrombine, diminue l'effet coagulant de cette dernière. Elles génèrent aussi un inhibiteur du facteur tissulaire, inhibant ainsi la coagulation. La fibrinolyse peut aussi être activée par synthèse et sécrétion de l'activateur de plasminogène tissulaire (t-PA) (**Preissner et coll., 2000**). De plus, la surface endothéliale comprend de nombreux récepteurs pour le plasminogène et un site spécifique pour le t-PA, augmentant ainsi la génération de plasmine localement, capable de dégrader la fibrine. En revanche dans certaines circonstances, telles une hémorragie ou une inflammation, l'endothélium a une action procoagulante médiée par l'induction de tissue-factor mais aussi de facteur Von Willebrand, élément essentiel pour l'interaction plaquettaire (**Pearson, 1999, Toborek et Kaiser, 1999**).

3.3. Vasorégulation

La dernière fonction est une fonction de vasorégulation. Depuis 1980, date où pour la première fois, Furchgott et Zawadzki ont montré que la relaxation d'aorte de lapin provoquée par l'acétylcholine impliquait la présence de cellules endothéliales, de nombreuses études ont clairement montré que l'endothélium jouait un rôle primordial dans la régulation locale de

l'activité vasculaire en synthétisant des substances vasodilatatrices et vasoconstrictrices (**Furchgott et coll., 1980**). En fonction du lit vasculaire considéré, les stimuli physiques ou chimiques peuvent entraîner différents niveaux d'intensité de relaxation dépendante de l'endothélium voire parfois de contraction (**Matz et Andriantsitohaina, 2003**).

Mais les effets de l'ensemble des substances vasoactives doivent être considérés dans un système communicant complexe. La fonction première du muscle lisse repose sur son pouvoir contractile en ce sens qu'une relaxation se définit en réalité par une moindre contraction. Si l'endothélium libère un médiateur vasoactif, alors chaque modification d'une réaction enzymatique ou d'une activation d'un canal ionique est systématiquement contrebalancée par une seconde réponse opposée de façon à limiter le déséquilibre du système. Classiquement, l'état de contraction du muscle lisse vasculaire est représenté par le nombre de chaînes légères de myosine phosphorylées (MLC20P) correspondant aux sites activés actine/myosine. C'est pourquoi, la régulation du tonus vasculaire peut être interprétée comme un équilibre entre les chaînes légères de myosine phosphorylées et celles qui ne le sont pas. Parmi les substances vasoactives qu'elles soient d'origine endothéliale, neuronale ou astrocytaire, certaines provoquent une relaxation, en activant la synthèse de monoxyde d'azote (NO), en favorisant la libération de prostacyclines (PGI₂) ou de substances hyperpolarisantes (EDHF) alors que d'autres, au contraire, induisent une contraction comme par exemple les endothélines, les endopéroxydes, le thromboxane A₂ mais aussi les prostaglandines.

En raison de sa faisabilité et de sa bonne reproductibilité, l'analyse de la vasorelaxation endothélium-dépendante reste le paramètre le plus utilisé pour apprécier la fonction endothéliale.

3.3.1. Les facteurs endothéliaux vasorelaxants

L'activation de la cellule endothéliale entraîne la synthèse et le relargage de facteurs relaxants qui conduisent à la relaxation de la cellule musculaire lisse sous-jacente. (Figure 2)

L'activation est secondaire au stimulus mécanique ou à des agonistes. Le stimulus mécanique sous la forme de l'augmentation du flux sanguin et donc des forces de cisaillement représente le meilleur stimulus pour entraîner la relaxation du vaisseau. Les agonistes sont soit des neurotransmetteurs, catécholamines et acétylcholine, soit des hormones, vasopressine, bradykinine, soit encore des dérivés plaquettaires, l'ADP et l'ATP. L'acétylcholine est

l'agoniste le plus fréquemment utilisé pour l'étude de la relaxation endothéliale dépendante tant chez l'homme que chez l'animal en particulier les rongeurs.

La fixation de l'agoniste sur son récepteur, parfois couplé à une protéine, entraîne l'activation d'un deuxième messenger qui est l'augmentation intracellulaire de Ca^{2+} . Pour exemple, chez l'homme, la relaxation de l'artère brachiale en réponse à l'acétylcholine est médiée par les récepteurs muscariniques M2 et M3. La fixation de l'agoniste sur son récepteur entraîne un couplage avec une protéine G intramembranaire sensible à la toxine pertussis. Ce couplage est responsable d'une activation de la phospholipase C qui elle-même va entraîner une augmentation de concentration calcique intracellulaire (**Busse et coll., 1993 ; Shimokawa, 1999**). La bradykinine entraîne elle aussi une augmentation intracellulaire de Ca^{2+} après fixation sur un récepteur kininergique B2 couplée à une protéine G insensible à la toxine pertussis mais qui active également la phospholipase C (**Brown & Roberts, 2001**).

En réponse à l'augmentation intracellulaire de Ca^{2+} , des facteurs relaxants sont synthétisés par l'endothélium. Trois principaux facteurs relaxants ont été décrits : La prostaglandine I2 ou prostacycline (PGI2), le NO et l'EDHF. (Figure 2)

3.3.1.a. Le monoxyde d'azote (figure 2)

La production et la libération du monoxyde d'azote par l'endothélium joue un rôle primordial dans la régulation du tonus vasculaire. Sans doute l'acteur le plus important des substances endothéliales, le NO encore appelé endothelium-derived relaxing factor (EDRF), induit une relaxation endothélium-dépendante (**Furchgott et coll., 1980**). Après sa libération par l'endothélium, le NO stimule la guanylate cyclase soluble du muscle lisse vasculaire, favorisant l'augmentation de la concentration intracellulaire en guanosine 3', 5' monophosphate cyclique (GMPc) (**Waldman et coll., 1987**). Le GMPc active à son tour une protéine kinase (PK) impliquée dans une cascade de phosphorylations. En effet, la protéine kinase catalyse le transfert d'un groupement phosphate de l'ATP vers d'autres enzymes et active notamment une phosphatase (MLCP) qui, à l'inverse, va supprimer un groupement phosphate aux chaînes légères de myosine (MLC20) responsable de la contraction musculaire lisse (**Busse et coll., 1993 ; Shimokawa, 1999**). En plus de ce mécanisme dépendant du GMPc, des travaux ont mis en évidence que le NO pouvait, dans certains territoires vasculaires, induire une relaxation en activant des canaux potassiques du muscle lisse (**Archer et coll., 1994 ; Bolotina et coll., 1994 ; Cohen et coll., 1995**).

La production de NO est assurée par la transformation de l'acide aminé L-arginine en L-citrulline catalysée par la NO synthétase (NOS). Le NO est produit à partir de l'atome

nitrogène guanido terminal de la L-arginine par une oxydation en cinq étapes. Trois isoformes de la NOS ont été identifiées et sont issues de gènes différents. Deux formes constitutives et dépendantes de la concentration de calcium intracellulaire sont distinguées, dont l'une existe au niveau endothéliale (NOS 3) et l'autre au niveau neuronal (NOS 1). La troisième forme (NOS 2) est inductible essentiellement dans des conditions de stress pathologique et ne dépend pas du calcium intracellulaire (**Lyons et coll., 1992 ; Forstermann et coll., 1995**). La NOS 3 est une nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH)-oxygénase dépendant qui requiert des cofacteurs tels la tétrahydroptérine (BH4), la flavine adénine dinucléotide et la flavine adénine mononucléotide (**Forstermann et coll., 1994, Moncada et coll., 1991**). En condition physiologique, de nombreuses substances telles que l'acétylcholine, la bradykinine, l'arginine vasopressine, la substance P, l'histamine se fixent sur des récepteurs spécifiques endothéliaux et sont capables d'activer la NOS 3, en favorisant l'entrée de calcium dans le cytoplasme de la cellule endothéliale. Cette entrée de calcium résulte de l'activation d'un récepteur dont les seconds messagers sont l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG) qui mobilisent dans un premier temps les réserves calciques intracellulaires, puis favorisent ensuite l'entrée capacitive du calcium extracellulaire via les canaux calciques SOCs (store-operated channels) afin de reconstruire les stocks intracellulaires. L'activation de la NOS dépend aussi de la concentration de calmoduline et nécessite un nicotinamide-adenine-dinucléotide-phosphate (NADPH) et une 5,6,7,8-BH4 réduits pour exprimer une activité optimale.

La NOS peut être inhibée de façon compétitive par des analogues de la L-arginine tels que le NG-monométhyl-L-arginine (L-NMA), la NG-nitro-L-arginine (L-NA) ou le NG-nitro-L-arginine ester méthylique (L-NAME).

Afin de limiter ses effets vasorelaxants, le NO est contre-régulé par deux mécanismes. Le premier inactive le NO lui-même qui est détourné très rapidement par $O_2^{\bullet-}$ pour former le peroxy-nitrite (ONOO⁻). Cette réaction est plus rapide que la dismutation catalysée par la superoxyde dismutase (SOD), une des enzymes de défense naturelle contre le stress oxydant (**Moncada et coll., 1995**). En condition physiologique, ce phénomène n'est pas cytotoxique puisque la concentration de peroxy-nitrite est très faible et présente même un double intérêt : atténuer l'action du NO et inhiber l'agrégation plaquettaire ainsi que l'adhésion leucocytaire (**Billiar et coll, 1995 ; Lefer et coll., 1997**). Les radicaux libres d'une façon générale peuvent activer les voies de synthèse des prostaglandines du muscle lisse connues pour induire une contraction. Le second mécanisme de contre-régulation repose sur les autres propriétés de la

substance et implique la voie du NO/GMPc. Par exemple, un agent relaxant comme l'acétylcholine active, dans un premier temps, un récepteur-canal au niveau endothélial favorisant ainsi l'entrée de calcium nécessaire à la NOS 3, alors qu'au niveau du muscle lisse, ce récepteur-canal existe également et favorise l'entrée de calcium dans la cellule musculaire, provoquant un effet vasoconstricteur.

Les cellules endothéliales ne libèrent pas le NO uniquement vers les cellules musculaires lisses mais également dans la lumière des vaisseaux sanguins. Par conséquent, le NO inhibe l'adhésion des plaquettes et des leucocytes sur l'endothélium. Il inhibe également la prolifération des cellules musculaires lisses et empêche la production des molécules d'adhésion et de l'endothéline.

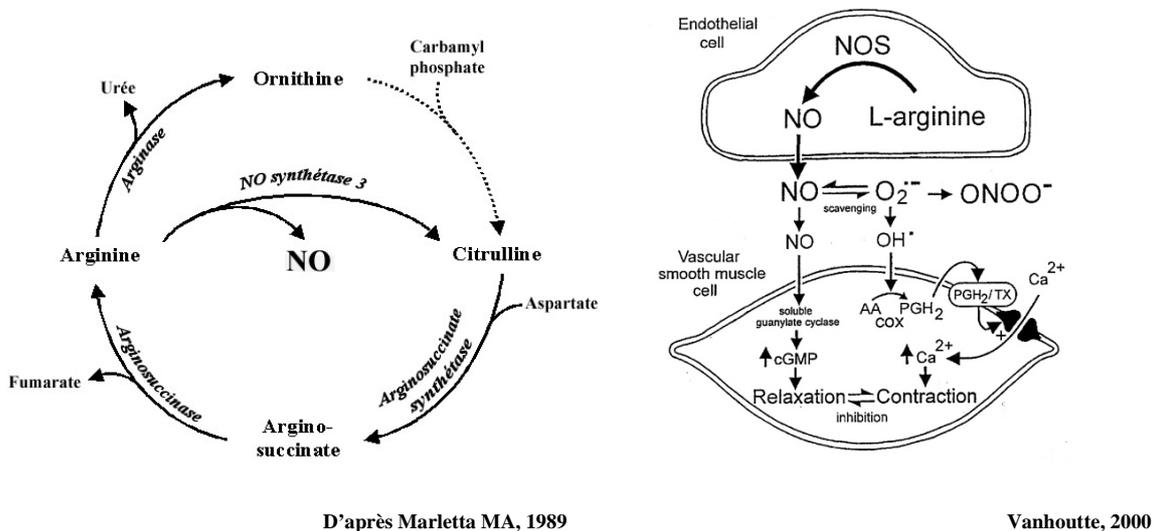


Figure 2. Synthèse et rôle du NO

3.3.1.b. La prostacycline

La synthèse de prostacycline active essentiellement l'adénylate cyclase soluble qui, au niveau du muscle lisse, favorise l'action de la PKA via la production d'AMPC. Cette dernière inhibe la kinase MLCK permettant de phosphoryler les chaînes légères de myosine induisant ainsi une relaxation (Narumiya et coll. 1999). La relaxation en réponse à la prostacycline est également le résultat de l'activation des canaux potassiques en particulier des canaux potassiques dépendants de l'ATP (K-ATP).

La prostacycline est un métabolite de l'acide arachidonique. Elle est produite avec d'autres prostaglandines et thromboxanes par deux cyclooxygénases (COX) appelées également prostaglandine H (PGH) synthétases (**Moncada et coll., 1978**). La COX-1 est exprimée de façon constitutive au niveau endothélial alors que la COX-2 est une forme inducible. Les stimuli d'induction de la COX-2 sont les mêmes que ceux impliqués dans l'activation de la forme inducible de la NOS 2. L'inflammation, l'administration de lipopolysaccharide, d'AMPc, l'hypoxie, certaines cytokines, facteurs de croissance ou hormones sont autant de stimuli qui favorisent l'expression de la COX-2. Dans des conditions de stress et d'activation, la COX-2 est la source prédominante de prostaglandines.

La relaxation due à la prostacycline est finement équilibrée par les différents métabolites de l'acide arachidonique puisque les PGH₂ et les thromboxanes ont un effet vasoconstricteur, en agissant sur la concentration intracellulaire de calcium dans les cellules musculaires lisses. Les stimuli modifiant l'expression de l'une ou de l'autre des isoformes des COX représentent autant de facteurs pouvant influencer l'état contractile du muscle lisse vasculaire (**Appleton et coll., 1996 ; Mitchell & Warner, 1999 ; Vane & Botting, 1998**).

Dans la plupart des vaisseaux sanguins, la prostacycline joue un rôle mineur dans la relaxation endothélium-dépendante, son effet vient surtout s'ajouter à celui du NO (**Vanhoutte, 2000**).

3.3.1.c. Les substances hyperpolarisantes dépendantes de l'endothélium

En plus de la production et de la libération de NO et de prostacycline, l'endothélium est capable d'induire une relaxation en agissant directement sur le potentiel de membrane des cellules musculaires lisses. L'ensemble de ces substances libérées par l'endothélium est appelé EDHF (endothelium-derived hyperpolarizing factor) et, hyperpolarise les cellules musculaires lisses. Les EDHF sont donc des substances dérivées de l'endothélium, libérées en réponse à une stimulation de l'endothélium par des agents tels que l'acétylcholine (ACh), capables d'hyperpolariser la cellule musculaire lisse. On distingue les EDHF diffusibles : K⁺, ETTs (acide epoxyeicosatriénoïque), H₂O₂, le peptide natriurétique type C et les facteurs non diffusibles comportant le flux d'hyperpolarisation via les jonctions myoendothéliales (**Campbell et Harder, 1999**). La contribution de l'EDHF à la relaxation endothélium-dépendante varie selon la taille des artères. La participation de l'EDHF est plus importante dans les vaisseaux de petit calibre, tels que les territoires coronaires, l'artère mammaire interne et les artères cérébrales (**Féléto & Vanhoutte, 2004**).

3.3.2. Les facteurs endothéliaux contractants

Par opposition aux facteurs responsables de la relaxation, l'endothélium est capable de libérer des substances vasoconstrictrices. Les agents contractants les plus importants synthétisés par l'endothélium sont l'endothéline, les prostaglandines, les radicaux libres, et l'angiotensine II. (Figure 3)

3.3.2.a. L'endothéline

Parmi les facteurs de contraction dérivés de l'endothélium (EDCF), l'endothéline (ET) a été la plus étudiée. Il existe trois isopeptides d'endothéline (ET-1, ET-2 et ET-3), chacun étant produit par des gènes différents. Les préproformes des peptides sont converties par une métalloprotéase de conversion des endothélines (ECE) au sein de la cellule endothéliale (**Goto et coll., 1996**). Des trois isoformes, seule l'ET-1 est produite en condition normale (**Rubanyi et coll, 1994**). L'expression des gènes des endothélines peut être stimulée par de nombreux facteurs tels que la thrombine, l'hémoglobine, le TNF α , le TGF β et peut être inhibée par le NO et le GMPc (**Boulangier et coll., 1990 ; Rubanyi et coll, 1994**).

Les effets des endothélines sont bien définis et passent par l'activation de deux types de récepteurs (ETA et ETB) qui ont une répartition différente. Le récepteur ETA est exprimé essentiellement dans le muscle lisse et participe à la contraction. Le second récepteur ETB est aussi exprimé par le muscle lisse mais se retrouve également au niveau endothélial. La stimulation de ces deux récepteurs dans la cellule musculaire lisse produit une contraction qui est dépendante de la concentration de calcium extracellulaire et active une PKC. Cette dernière va freiner l'activité de la phosphatase des MLCP favorisant l'état phosphorylé de la myosine et donc la contraction. En revanche, le récepteur ETB présent sur l'endothélium limite la contraction puisque sa stimulation active la NOS endothéliale et par conséquent produit et libère le NO (figure 3).

3.3.2.b. Les autres facteurs de contraction dérivés de l'endothélium

De nombreux autres facteurs endothéliaux peuvent intervenir dans les effets vasoactifs décrits précédemment. Ces substances sont des espèces réactives de l'oxygène et les EDCFs distincts de l'endothéline. Ces EDCFs sont, pour beaucoup d'entre eux, des métabolites de l'acide arachidonique produits par la voie des COX endothéliales et favorisent la contraction via des récepteurs PGH₂-thromboxane A₂ (**Moncada et coll., 1978**). La stimulation de ces récepteurs

permet l'ouverture des canaux calciques de la cellule musculaire lisse (Kato et coll., 1990, Lin et coll.) (figure 3).

Les neutrophiles, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses produisent des radicaux libres quand ils sont activés. Les anions superoxydes $O_2^{\bullet-}$ résultent de nombreuses enzymes, tels les NOS, les COX, la NAPDH oxydase (Zalba et coll., 2000). $O_2^{\bullet-}$ entraînent une contraction de la cellule musculaire lisse par des mécanismes directs et indirects. D'une part, $O_2^{\bullet-}$ facilite la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire entraînant une contraction de la cellule musculaire lisse (Zalba et coll. 2000). D'autre part, $O_2^{\bullet-}$ diminue la biodisponibilité du NO en formant avec le NO du peroxynitrite (Rubanyi & Vanhoutte, 1986).

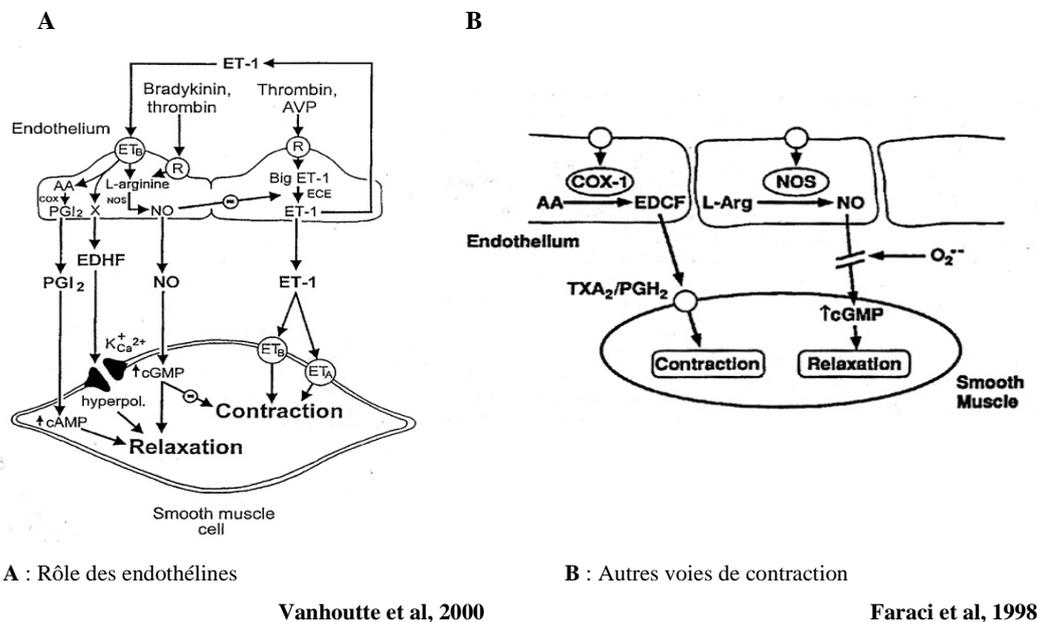


Figure 3. Voies de contraction

4. DYSFONCTION ENDOTHELIALE

4.1. Définition

La dysfonction endothéliale se définit par un phénomène complexe qui peut toucher les différentes fonctions de l'endothélium. Ainsi l'altération peut être définie comme un déséquilibre entre vasodilatation et vasoconstriction, un déséquilibre entre action antithrombogène et procoagulante, ou encore comme une anomalie de la perméabilité. Mais

les fonctions de l'endothélium sont interconnectées et l'altération d'une fonction a des conséquences sur les autres. La majorité des études expérimentales et cliniques s'intéressant à l'endothélium, réduisent la fonction endothéliale aux fonctions vasomotrices, en particulier aux capacités de relaxation endothélium-dépendante.

4.2. Dysfonction endothéliale : pertinence clinique

Une diminution de la vasorelaxation coronarienne à l'acétylcholine a été initialement décrite chez des patients coronariens (**Ludmer et coll., 1986**). De nombreuses études ont montré par la suite une association entre la dysfonction endothéliale et la présence soit de facteurs de risque d'athérosclérose, soit de l'athérosclérose (**Landmesser et coll., 2004**). Les données objectivant l'intérêt clinique de l'évaluation de la dysfonction endothéliale comme marqueur pronostique indépendant des traditionnels facteurs de risque sont cependant beaucoup plus récentes. Ainsi, il existe une augmentation significative de la fréquence des événements vasculaires chez les patients avec cardiopathie ischémique modérée et altération de la vasorelaxation coronarienne (**Suwaidi et coll., 2000**). Halcox rapporte des résultats similaires sur un suivi de 46 mois en mesurant la résistance vasculaire coronarienne en réponse à l'infusion intracoronarienne d'acétylcholine (**Halcox et coll., 2002**). Il faut souligner que, dans l'étude, la dysfonction endothéliale prédit l'augmentation du risque d'événements vasculaires chez des patients dont l'angiographie coronaire est normale. D'autres essais analysant la fonction endothéliale sur les artères périphériques retrouvent des résultats comparables (**Kuvin et coll., 2001**).

Les résultats de Modena et coll. constituent l'étape suivante dans l'utilisation clinique de l'étude de la dysfonction endothéliale (**Modena et coll., 2002**). En effet, leur travail suggère que l'amélioration de la fonction endothéliale permet d'identifier un groupe dont le pronostic vasculaire s'améliore. Dans l'étude, 400 femmes ménopausées avec hypertension et altération de la vasomotricité brachiale ont été incluses. Après 6 mois de traitement optimisé de l'hypertension, la vasomotricité brachiale reste anormale chez 150 patientes alors qu'elle s'améliore significativement (vasodilatation liée au flux augmentée de plus de 10%) chez les 250 patientes restantes. A 5 ans de traitement, les patientes dont la vasomotricité restait anormale présentent significativement plus d'événements vasculaires. Il s'agit de la première étude qui démontre que l'analyse séquentielle de la dysfonction endothéliale est utile pour apprécier la réponse à long terme à une intervention thérapeutique. Par conséquent,

l'évaluation de la dysfonction endothéliale pourrait identifier des patients particulièrement à risque, qui pourraient bénéficier d'une prise en charge thérapeutique plus agressive.

4.3. Altérations de la relaxation endothélium-dépendante : méthodes d'étude

La relaxation endothélium-dépendante peut être évaluée *in vitro* ou *in vivo* chez l'animal ou chez l'homme (**Vanhoutte, 1999**).

In vitro, la plupart des études impliquent des techniques de vaisseaux isolés en chambre d'organe permettant l'évaluation, soit des contractions/relaxations isométriques du muscle vasculaire (mesures de tension), soit des vasoconstrictions/vasodilatations (mesures de diamètre) sur vaisseaux perfusés. Ces techniques s'adressent à des artères de gros calibre (vaisseau de conductance), à des artères de résistance (vaisseaux d'un diamètre inférieur à 300 μm), ou encore, à des organes entiers perfusés (cœur, mésentère). Les capacités vasodilatatrices sont évaluées par l'utilisation d'agonistes récepteurs dépendants (acétylcholine, bradykinine, sérotonine) ou indépendants (ionophore calcique A23187), ou bien, en soumettant l'endothélium à des stimuli physiologiques tels que l'agrégation plaquettaire, ou à des déformations consécutives aux variations des forces de cisaillement exercées un flux (dilatations flux-dépendantes). La libération basale de facteurs endothéliaux vasorelaxants, en particulier le NO peut également être évaluée en comparant les réponses contractiles induites par exemple par un agoniste $\alpha 1$ -adrénergique ou, par l'angiotensine II, en présence ou non de l'endothélium ou bien, en présence ou non d'inhibiteur de la synthèse du NO.

In vivo, l'infusion intracoronarienne d'acétylcholine avec mesure de flux par doppler représente le « gold standard ». Cependant, cette méthodologie est limitée par son caractère invasif, le risque de complications et le coût. Aujourd'hui, l'analyse par échographie-doppler de la vasodilatation des artères périphériques (humérale ou radiale) en phase d'hyperémie s'est largement développée. En pratique, une ischémie du bras est réalisée à l'aide d'un brassard gonflé à une pression suprasystolique pendant 5 minutes. Le dégonflage du brassard entraîne une phase hyperémique de la main liée à une vasodilatation des vaisseaux NO-dépendante. Si l'endothélium est sain, une augmentation du diamètre de l'artère de 3 à 5% est observée. Il est admis que les anomalies de la vascularisation périphérique observées par cette technique sont corrélées à l'existence d'une dysfonction endothéliale coronarienne. Cette technique non invasive souffre cependant d'une part, d'un manque de standardisation (durée

de l'ischémie, temps de mesure, localisation du brassard) entre les différents laboratoires qui la pratiquent et d'autre part, d'un manque de reproductibilité inter-opérateur (**Kuvin et coll., 2003**).

PREMIERE PARTIE
LE VIEILLISSEMENT ARTERIEL
LIE A L'AGE

1. LA STRUCTURE DU VAISSEAU AU COURS DU VIEILLISSEMENT ARTERIEL LIE A L'AGE (Lakatta, 2003, part I,II,III)

Avec l'avancée en âge, tous les composants de la paroi artérielle se modifient. A l'échelle macroscopique, le calibre des artères augmente et leur paroi s'épaissit. Au niveau des grosses artères élastiques, le diamètre du vaisseau tend à augmenter progressivement et régulièrement avec l'âge indépendamment de la pression artérielle alors qu'au niveau des petites artères musculaires, la majoration du diamètre externe est moins importante mais l'augmentation de l'épaisseur pariétale entraîne une diminution du diamètre interne.

Sur le plan histologique, les modifications touchent toutes les tuniques de l'artère. L'épaisseur intima-média augmente considérablement avec l'âge. Chez l'homme, elle est multipliée par 2 à 3 entre 20 et 90 ans. Cet épaississement résulte principalement de l'accumulation de molécules de la matrice extracellulaire et de cellules musculaires lisses. Dans l'intima, les cellules endothéliales présentent des modifications avec un alignement moins net, des cellules plus aplaties ou, au contraire, hypertrophiées et irrégulières. L'intima épaissie du rat âgé est composée de collagène, fibronectine, protéoglycanes et de cellules musculaires lisses. La migration des cellules musculaires de l'intima vers la média est la conséquence de l'augmentation de perméabilité de la membrane basale. L'accumulation de glycoaminoglycanes dans l'intima joue un rôle important dans la survenue de cette hyperperméabilité vasculaire tout comme l'augmentation des métalloprotéases (MPP). En effet, la MMP-2, sécrétée par des cellules musculaires activées, entraîne une rupture des lames élastiques de la paroi. Le contenu en collagène augmente également dans la média. Un doublement de la quantité de collagène a été observé entre 6 et 30 mois chez des rats WAG/Rij, dont la pression artérielle reste constante au cours de la vie. Ainsi la destruction de l'élastine et l'augmentation du contenu en collagène inverse le rapport élastine/collagène de la média au cours du vieillissement.

2. LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE AU COURS DU VIEILLISSEMENT ARTERIEL LIE A L'AGE

2.1. Caractéristiques

L'étude des modifications de la relaxation endothélium-dépendante au cours du vieillissement a été réalisée sur les larges artères comme sur les petites artères résistives et dans différentes espèces et races animales ainsi que chez l'homme. Dès 1988, Koga et coll montraient une réduction de la relaxation de l'aorte à l'acétylcholine avec l'âge chez le rat Wistar Kyoto. Celle-ci survient rapidement au cours de la vie, puisque la relaxation maximale est diminuée de 50% chez les rats âgés de 3 à 6 mois comparés à des rats âgés de 4 à 6 semaines. La diminution de la relaxation endothélium-dépendante s'aggrave avec l'âge puisqu'elle n'est plus que de 25% de celle retrouvée chez les jeunes rats entre 12 et 25 mois (**Koga et coll., 1988**). D'autres études réalisées également chez les rats, ont montré l'altération de la relaxation endothélium-dépendante avec l'âge mais sans notion de cinétique, 2 groupes d'animaux étaient comparés, à savoir un groupe jeune et adulte vieux. En 1995, Küng et Luscher ont comparé la relaxation de l'aorte dans deux races de rats, Wistar Kyoto et SHR, ces derniers développant une hypertension artérielle. Dans chacune de ces races, des rats jeunes de 12 à 14 semaines étaient comparés à des rats adultes, âgés de 72 à 74 semaines. Les auteurs ont montré une diminution de 25% de la relaxation maximale chez les rats Wistar Kyoto les plus âgés. En revanche, il n'était pas noté d'aggravation de la relaxation maximale à l'acétylcholine chez les rats SHR âgés comparés aux jeunes rats SHR qui ont une relaxation endothélium-dépendante altérée comparée au rat Wistar Kyoto du même âge (**Küng et Luscher, 1995**). Hongo et coll, ont montré chez des rats Wistar Kyoto, une altération de la relaxation à l'acétylcholine au niveau de la carotide à l'âge de 11 mois comparés à de jeunes rats de 14 semaines, retrouvant une diminution de 30% de la relaxation maximale dans le groupe le plus âgé (**Hongo et coll., 1988**). L'altération de la relaxation endothélium-dépendante a été moins étudiée mais néanmoins rapportée sur des artères résistives par Matz et Atkinson notamment au niveau de l'artère mésentérique chez des rats Wistar Kyoto (**Atkinson et coll., 1994, Matz et coll., 2000**). Cette altération de la relaxation n'est pas restreinte à la relaxation secondaire à l'acétylcholine. En effet toujours chez les rats, une diminution de la relaxation endothélium-dépendante a été décrite au niveau des artères cérébrales avec pour stimulus la bradykinine, la sérotonine ou l'ATP (**Hajdu et coll., 1994**) et au niveau aortique avec l'histamine (**Mayhan et coll., 1993**). Si les rongeurs et principalement, le rat Wistar Kyoto ont été le principal modèle d'étude de la relaxation endothélium-dépendante, le chien et le singe âgés en sont d'autres. Le chien âgé présente une altération de la relaxation acétylcholine dépendante des artères mésentériques et des artères

des pattes (**Shimizu et Toda, 1986 , Haidet et coll., 1995**), le singe âgé a une altération de la réponse vasculaire périphérique à l'acétylcholine comparé au singe jeune (**Asai et coll.,2000**). Enfin, chez l'homme, la perte de relaxation endothélium-dépendante avec l'avancée en âge a été principalement étudiée et retrouvée au niveau de l'artère du bras et des artères coronaires (**Taddei et coll., 1995**). Celermajer et coll ont étudié le shear stress au niveau de l'artère brachiale dans une population d'hommes et de femmes sans facteur de risque vasculaire connu et âgés de 15 à 72 ans. Ils ont ainsi montré une corrélation négative entre l'avancée en âge et l'altération de la relaxation induite par le flux sanguin. Cette altération survient après l'âge de 40 ans pour les hommes, à raison d'une diminution de 0,21%/an et après 50 ans pour les femmes à raison de 0,49%/an. (**Celermajer et coll., 1994**). La corrélation entre l'âge et la perte de relaxation endothélium-dépendante a été retrouvée par Sarabi et coll qui montrent également que cette perte de relaxation est plus importante pour les femmes après la ménopause qu'avant, rejoignant ainsi la vitesse de la perte de relaxation des hommes. Dans cette étude, chez les femmes, le seul facteur de risque indépendant de survenue et d'aggravation de la diminution de la relaxation endothélium-dépendante est l'âge (**Sarabi et coll., 1999**). A partir de 1990, les études se sont succédées pour montrer l'apparition et l'aggravation de la relaxation endothélium-dépendante avec l'âge et tenter d'en comprendre les mécanismes (**Taddei et coll., 1995**).

2.2. Molécules d'adhésion et vieillissement artériel lié à l'âge

Les molécules d'adhésion sont des protéines proinflammatoires qui jouent un rôle crucial dans l'interaction cellule/cellule et cellule/ matrice extracellulaire. Parmi elles, E-selectin, P-selectin, VCAM-1, et ICAM-1 contrôlent l'adhésion des leucocytes/monocytes à l'endothélium, et la migration à travers le vaisseau participant ainsi à la réponse immunitaire et au processus inflammatoire.

L'augmentation de l'expression de ces molécules d'adhésion a été montrée dans l'aorte de rats âgés (**Li et coll., 1999, Zou et coll. 2004, Zou et coll. 2006**).

2.3. Mécanismes responsables de l'altération de la relaxation endothélium-dépendante au cours du vieillissement artériel lié à l'âge

Les mécanismes de survenue de la dysfonction endothéliale au cours du vieillissement ont commencé à être étudiés il n'y a que quelques années. Plusieurs mécanismes ont ainsi

émergés. La dysfonction endothéliale peut être la conséquence de l'altération des moyens de relaxation qui peut être liée soit à une anomalie de production des agents relaxants, soit à une anomalie des effets des agents relaxants.

2.3.1. Nombre et sensibilité des récepteurs agonistes endothéliaux

La dysfonction endothéliale ne semble pas liée à la diminution du nombre de récepteurs agonistes incluant les récepteurs muscariniques pour l'acétylcholine ni à une réduction de la sensibilité de ces récepteurs. En effet aucun déficit d'un récepteur agoniste membranaire n'a encore été rapporté. La dysfonction endothéliale ne semble pas non plus liée à un défaut de transduction du signal des récepteurs muscariniques, une anomalie de relaxation ayant été trouvée avec d'autres agonistes tels l'ATP (**Hongo et coll.,1988**) et l'histamine (**Moritoki et coll., 1986**) par exemple chez l'animal âgé. L'altération de la production d'un deuxième messager peut être également écartée. En effet, la vasodilatation endothélium-dépendante récepteur indépendant étudiée chez le rat et induite par le calcium ionophore, A23187 est diminuée avec l'âge à la fois dans les artères élastiques et dans les artères résistives (**Barton et coll., 1997 ; Matz et coll., 2000**). De même, chez l'homme, la relaxation induite par le shear stress diminue avec l'âge (**Celermajer et coll., 1994 ; Jensen-Urstad et Johansson, 2001**).

2.3.2. Réponse de la cellule musculaire lisse aux agents vasorelaxants

La diminution de la vasodilatation endothélium-dépendante pourrait être expliquée au moins en partie, par une atténuation de la sensibilité de la cellule musculaire lisse aux agents relaxants, tels le NO ou la prostacycline. Mais de nombreuses études ont montré que la réponse de la cellule musculaire lisse aux donneurs de NO, nitroglycérine et nitroprussiate de sodium, était conservée au cours du vieillissement tant dans les artères élastiques que résistives. (**Barton et coll., 1997 ; Koga et coll., 1988, Matz et coll., 2000 ; Celermajer et coll., 1994 ; Barton et coll., 1997 ; Taddei et coll., 2001**). Néanmoins il a été noté une diminution avec l'âge de la réponse au NO dans les artères mésentériques perfusées chez le rat (**Atinkson et coll., 1994**), l'aorte de lapin (**Chinellato et coll., 1991**) et les vaisseaux de la peau chez l'homme (**Algotsson et coll., 1995**). Ces discordances peuvent être expliquées par des espèces et des races animales différentes, des types de vaisseaux différents et des préparations différentes.

2.3.2.a. La voie du NO

La réduction de la relaxation médiée par le NO avec l'âge peut s'expliquer soit par une diminution de la synthèse de NO, soit par une dégradation accrue du NO. La contribution de NO dans la relaxation semble s'atténuer avec l'âge. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de NOS montre que la contribution du NO en réponse à l'acétylcholine est moins affectée dans l'aorte de rat âgé (70-100 semaines) comparée à celle du jeune rat (12-14 semaines) (**Matz et coll., 2000**).

Substrat

Bien que les concentrations circulantes d'arginine, substrat de la eNOS soient comparables chez les adultes et vieux rats, la supplémentation en arginine améliore la relaxation endothéliale dépendante dans les études expérimentales et cliniques. Ainsi l'arginine améliore la relaxation à l'acétylcholine de l'aorte de rat âgé (**Xiong et coll., 2001**). La perfusion d'arginine restaure la relaxation de l'artère brachiale au-delà de 60 ans (**Chauhan et coll., 1996**) et des artères coronaires (**Drexler et coll., 1991**). L'altération du transport de l'arginine dans la cellule endothéliale pourrait être un des mécanismes de l'altération de la voie du NO au cours du vieillissement (**Zhang et coll., 2001**).

eNOS

La eNOS possède des inhibiteurs compétitifs endogènes, tel l'ADMA. L'ADMA est présent dans le sang et l'urine chez l'animal et l'homme (**Xiong et coll., 2001**). Les concentrations sériques de l'ADMA augmentent avec l'âge chez le rat (**Xiong et coll., 2001**). Ainsi cette molécule pourrait également jouer un rôle dans la survenue de la dysfonction endothéliale liée à l'âge.

Le déficit d'un cofacteur de la eNOS, la BH4 induit une diminution de l'activité de la eNOS associée à une réduction de la production de NO et une augmentation de la formation des radicaux libres (**Higashi et coll., 2005**). La BH4 est détruite par les radicaux libres, avec pour conséquence une diminution de synthèse de la eNOS (**Scotland et coll., 2002**). L'administration de BH4 améliore la fonction endothéliale et cette amélioration est d'autant plus importante que le sujet est âgé (**Higashi et coll., 2005**).

L'expression de la eNOS augmente au cours du vieillissement tant dans l'aorte que dans les artères mésentériques des vieux rats, en revanche, l'activité de la eNOS diminue (**Cernadas et coll., 1998**).

NO

La disponibilité du NO résulte d'un équilibre entre synthèse et inactivation. Cette dernière qui joue un rôle important dans la régulation du NO, implique à la fois liaison et catabolisme du NO (figure 4).

Le NO peut former des complexes avec des protéines contenant l'élément fer, cuivre ou des groupements thiols, réalisant ainsi une forme de transport (Stamler, 1994 ; Stoclet, 1999).

Le NO peut également être piégé au sein de la paroi vasculaire. Les produits finaux de la glycation sont produits par la glycation non enzymatique et l'oxydation des lipides et des protéines après exposition aux sucres. Les AGEs augmentent avec l'âge et sont responsables d'une désorganisation de l'assemblage des protéines matricielles et du pontage des protéines, en particulier du collagène. Le collagène ponté entraîne une moindre sensibilité aux collagénases et piège le NO au sein de ce maillage, phénomène de quenching, diminuant la disponibilité du NO.

Stress oxydant

Le stress oxydant est représenté par l'ensemble des réactions faisant intervenir des espèces réactives de l'oxygène, elles-mêmes caractérisées par la présence d'un électron célibataire très réactif. Dans l'organisme, le stress oxydant permet de réguler *via* un contrôle sur le facteur nucléaire Nuclear Factor Kappa B (NF-κB), un nombre important de gènes pro- et anti-apoptotiques tels que bax et bcl₂. Outre ses modulations transcriptionnelles, le stress oxydant pourrait induire des oxydations de haute toxicité au sein des lipides, des protéines et de l'ADN s'il n'était pas finement régulé par des systèmes de défenses antioxydantes intracellulaires.

Les principales espèces radicalaires dérivées de l'oxygène sont: l'anion superoxyde O₂^{•-}, le radical hydroxyle °OH, et bien qu'ils ne soient pas radicalaires mais très réactifs et producteurs de radicaux, le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et le monoxyde d'azote NO.

Il existe des mécanismes de défense face au stress oxydant qui comportent des enzymes de détoxification : superoxyde dismutase, catalase et peroxydase dont la glutathion peroxydase et des substrats dit « suicides » qui tamponnent les espèces réactives. Ces molécules peuvent être lipophiles comme le tocophérol, bêta-carotène ou hydrosolubles tels que l'acide ascorbique ou urique.

La demi-vie du NO est très courte en raison de son inactivation très rapide par les radicaux libres et principalement le superoxyde $O_2^{\bullet-}$. L'augmentation de $O_2^{\bullet-}$ a été retrouvée dans l'aorte de rat âgé, associée à une augmentation de nitrotyrosine, un marqueur de formation de peroxynitrite et une diminution de NO (Van der Loo et coll., 2000). Dans des conditions physiologiques, les défenses antioxydantes telles la superoxyde dismutase (SOD) préservent l'équilibre pro et antioxydant. Cet équilibre est altéré au cours de processus pathologiques mais également au cours du vieillissement, conduisant à une augmentation des radicaux libres et donc à une diminution de la biodisponibilité du NO.

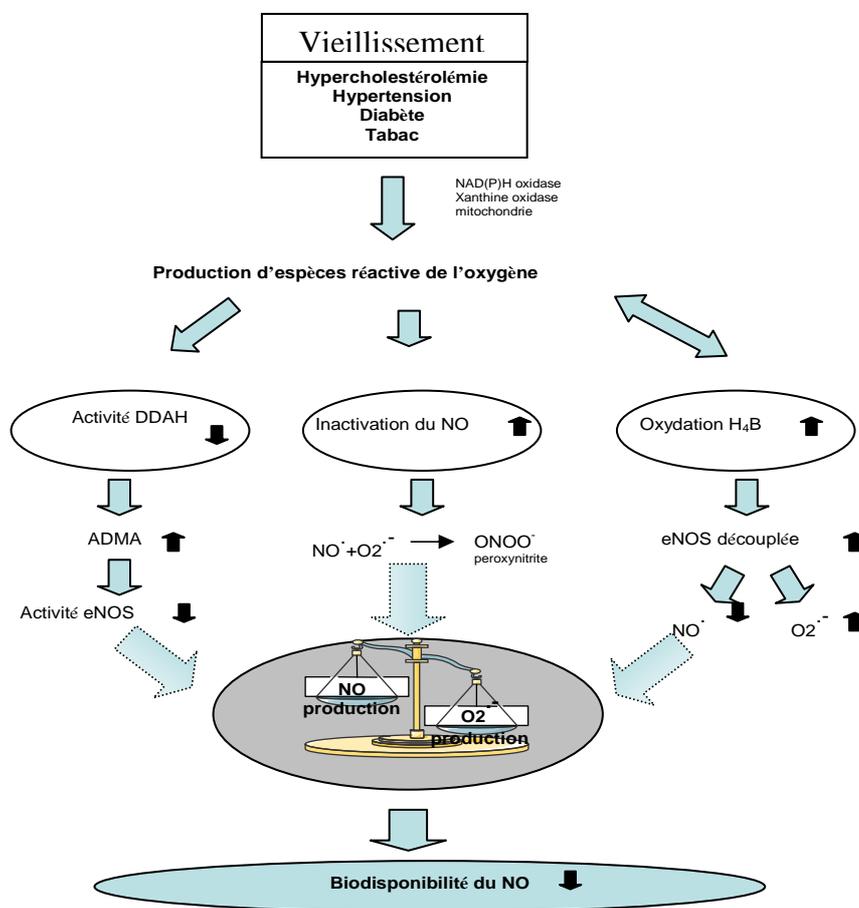


Figure 4. Mécanismes de diminution de la biodisponibilité du NO.
 DDAH : Diméthylarginine Diméthylaminohydrolase, ADMA : diméthylarginine asymétrique ; BH₄ : tétrahydrobioptérine. (Landmesser et coll. , 2004)

2.3.2.b. La voie des cyclooxygénases

Chez l'homme, il a été observé que l'indométhacine potentialisait l'effet relaxant de l'acétylcholine chez les sujets de plus de 60 ans (**Taddei et coll., 1997**). Cet effet de l'indométhacine, inhibiteur de COX, révèle une augmentation de la participation des métabolites vasoconstricteurs des COX dans l'aorte et les artères mésentériques de rats âgés lors de la relaxation à l'acétylcholine. Les COX 1 et 2 sont augmentées dans l'aorte de rat âgé (**Matz et coll., 2000**). L'augmentation des métabolites vasoconstricteurs qui pourraient contribuer à la perte de relaxation endothélium-dépendante avec l'avancée en âge a été corrélée avec l'augmentation de la peroxydation lipidique chez les rats (**Davidge et coll., 1996**).

Par ailleurs, l'expression de l'ARNm du récepteur de la prostacycline est diminuée sur les cellules musculaires lisses chez l'animal âgé, participant également à l'altération de la fonction endothéliale au cours du vieillissement.

3.3. Dysfonction endothéliale liée à l'âge, un phénomène réversible ?

Si la dysfonction endothéliale est reconnue être un mécanisme survenant avec l'avancée en âge et être un facteur favorisant la survenue d'évènements vasculaires, il paraît nécessaire de prévenir cette dysfonction ou de restaurer la fonction endothéliale quand elle est altérée.

La description des mécanismes impliqués dans la dysfonction endothéliale liée à l'âge aide à définir des molécules potentielles candidates à l'amélioration de la fonction endothéliale. Deux grandes catégories de molécules peuvent être évoquées : d'une part les molécules permettant d'augmenter la synthèse du NO et d'autre part les molécules augmentant la biodisponibilité du NO principalement par la diminution du stress oxydant.

3.3.1. Supplémentation en arginine et donneurs de NO

Arginine

L'administration aiguë d'arginine restaure la fonction endothéliale chez l'homme âgé (**Chauhan et coll., 1996 ; Taddei et coll., 1997**). Néanmoins, les sujets âgés de plus de 60 ans ont une moindre réponse à l'administration aiguë d'arginine (**Taddei et coll., 1997**). De plus il n'existe pas de données sur l'administration au long cours de cette molécule au cours du vieillissement physiologique, la supplémentation chronique ayant été réalisée dans des

modèles d'hypercholestérolémie, de microangiopathie coronaire et d'athérosclérose (**Drexler et coll., 1991 ; Lerman et coll., 1998**) avec au total des résultats peu démonstratifs probablement en raison des faibles effectifs inclus dans les études, des durées brèves des études ou les deux (**Preli et coll., 2002**).

Donneurs de NO

L'administration de donneurs de NO, nitrates organiques, nitroprussiate de sodium par exemple, augmente temporairement les concentrations de NO mais ne corrige pas la dysfonction endothéliale. Les donneurs de NO ne constituent donc pas un traitement adapté de la dysfonction endothéliale liée à l'âge.

3.3.2. Augmentation de la biodisponibilité de NO

3.3.2.a. Tétrahydrobioptérine (Hashi et coll., 2006)

Les mécanismes d'action de la tétrahydrobioptérine, font placer ce cofacteur de la eNOS tant dans le paragraphe précédent que dans celui-ci. L'administration aiguë de tétrahydrobioptérine chez l'homme améliore la relaxation endothélium-dépendante. Les mécanismes possibles sont une augmentation de la synthèse de NO par la eNOS et une diminution de la synthèse de ROS générés par la eNOS en l'absence de cofacteur ce qui permet une augmentation de la biodisponibilité du NO. Cette diminution du stress oxydant après apport de tétrahydrobioptérine est authentifiée par la diminution des concentrations urinaires de 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OhdG) et de malondialdéhyde (MDA). Mais l'action d'un traitement chronique par tétrahydrobioptérine dans un modèle de vieillissement physiologique reste actuellement inconnue.

3.3.2.b. Anti-oxydant

Les thérapies anti-oxydantes semblent intéressantes pour la prévention de la dysfonction endothéliale liée à l'âge ou la restauration de la fonction endothéliale.

L'acide ascorbique administré en une injection ou à long terme améliore la fonction endothéliale dans des modèles d'athérosclérose, d'hypercholestérolémie, de tabac ou d'hypertension (**Heitzer et coll., 1996 ; May, 2000 ; Ting et coll., 1996**). Les mécanismes impliqués sont une diminution de l'oxydation des LDL, un relargage de NO à partir de S-nitrosothiols circulants ou tissulaires et l'activation de l'eNOS ou de la guanylate cyclase du muscle lisse (**May, 2000**). L'acide ascorbique corrige la dysfonction endothéliale liée à l'âge

après perfusion chez des sujets de plus de 60 ans. L'action sur la dysfonction endothéliale liée à l'âge d'un traitement au long cours par l'acide ascorbique n'est pas connue. En revanche, l'administration de vitamine E (1000IU/day) chez des personnes âgées pendant 10 semaines n'améliore pas la fonction endothéliale (**Simons et coll., 1999**).

3.3.2.c. Inhibiteur de la HMG-CoA réductase.

L'amélioration de la fonction endothéliale par les inhibiteurs de la HMG-CoA réductase est un effet de classe. La dernière étude a été réalisée avec la simvastatine chez des rats âgés et montre une amélioration de la fonction endothéliale chez les vieux animaux traités. Le mécanisme de l'amélioration est indépendant de la capacité de ces molécules à diminuer le cholestérol circulant. La HMG-CoA réductase inhibe une sous-unité de la NADPH oxydase, scavenger de NO (**Vecchione et Brandes, 2002**) et permet ainsi l'amélioration de la biodisponibilité du NO.

3.3.2.d. Inhibiteurs de l'enzyme de conversion

Ils améliorent la fonction endothéliale dans différents modèles dont le vieillissement physiologique (**Atkinson et coll., 1994**). Le mécanisme d'action impliqué est une diminution de la formation des ROS induit par l'angiotensine II.

3.3.2.e. Activité physique

Dans une étude randomisée, trois mois d'exercice physique, marche de 30 minutes par jour, 3 à 4 fois par semaine, ont permis d'améliorer la fonction endothéliale chez les participants âgés comparés à des sujets témoins de même âge (**DeSouza et coll., 2000**) avec toujours pour mécanisme retenu, la diminution du stress oxydant permettant une meilleure biodisponibilité du NO.

Hormis l'activité physique, parfois difficilement réalisable, particulièrement dans des populations âgées, aucune thérapeutique n'a encore montré un effet à long terme sur la fonction endothéliale.

4. L'ASPIRINE

Les salicylates sont utilisés comme analgésiques depuis Hippocrate et leurs effets antipyrétiques sont connus depuis plus de 200 ans. Vers 1890, l'acide acétylsalicylique est entré dans la pharmacopée pour traiter des états inflammatoires. Ce n'est que 70 ans plus tard, que l'aspirine a été utilisée dans les maladies vasculaires en raison de son effet antiagrégant plaquettaire, le rôle central des plaquettes dans les maladies vasculaires ayant alors été avancé. Une forte inhibition de la COX-1 secondaire à une acétylation irréversible par l'aspirine qui permet l'inhibition de l'agrégation plaquettaire (**Awtry et coll., 2000**).

Cependant il existe de plus en plus d'arguments pour penser que l'action de l'aspirine ne passe pas seulement par l'inactivation plaquettaire.

4.1. Aspirine et maladies vasculaires (Patrono et coll., 2005)

L'efficacité de l'aspirine, en prévention des accidents vasculaires a été évaluée dans plusieurs populations, allant de populations apparemment saines et à faible risque vasculaire à des populations de patients ayant présenté un infarctus du myocarde (IDM) ou un accident vasculaire cérébral (AVC) (**Antiplatelet Trialists' Collaboration, 2002 ; Campbell et coll., 2007; Patrono et coll., 2004**).

Une métaanalyse d'essais de thérapies antiplaquettaires indique que l'aspirine réduit le risque d'événements vasculaires d'approximativement 25%, avec une diminution de 34% du taux d'IDM non fatal, de 25% d'AVC ischémique non fatal, et une diminution d'1/6 du taux de décès de cause vasculaire ou inconnue, pour les patients présentant une maladie vasculaire. Parmi les patients pour qui le risque d'AVC grave est estimé entre 4 et 8 pourcent/an, l'aspirine prévient 10 à 20 événements vasculaires fatals ou non pour 1000 patients traités pendant une année (**Antiplatelet Trialists' Collaboration, 2002 ; Patrono et coll., 2005**).

En prévention primaire, les données concernant l'intérêt de l'aspirine à faible dose sont plus confuses. Une métaanalyse de cinq essais cliniques réalisés en prévention primaire indique que de faibles doses d'aspirine sont associées à une diminution significative de 32% du risque de survenue d'IDM (**Collaborative Group of the Primary Prevention Project, 2001 ;Hansson et coll., 1998 ; The Medical Research Council's General Practice Framework, 1998 ; Peto et coll., 1988 ; Steering Committee of the Physicians'Health Study Research group, 1989**) ce qui est similaire au bénéfice de la prévention secondaire, mais en revanche, il n'existe pas d'effet significativement positif sur la survenue d'AVC ischémique. Plus récemment, un suivi de 10 ans de 40000 femmes de plus de 45 ans à l'inclusion en bonne

santé et prenant de l'aspirine à faible dose, a montré une diminution de 17% du risque de survenue d'AVC ischémique, mais aucun bénéfice sur la survenue d'IDM (**Sanmuganathan et coll., 2001**). Dans cette même étude, l'analyse du sous groupe des femmes de plus de 65 ans a montré un bénéfice majoré de la prise d'aspirine à faibles doses avec une réduction de 44% de survenue d'IDM, d'AVC ischémique et de décès par cause cardio-vasculaire. Enfin une métaanalyse de 6 essais randomisés de plus de 50 000 femmes et 40 000 hommes, montre que l'aspirine à faible dose est associée à une diminution significative du nombre des événements vasculaires dans les deux sexes (**Berger et coll., 2006**).

4.2. Aspirine, mode d'action dans la prévention des maladies vasculaires

Les effets protecteurs de l'aspirine ont été décrits comme principalement liés à l'inhibition de la COX-1 dans les plaquettes avec pour conséquences une diminution de production des thromboxanes, et l'inhibition de l'activation et de l'agrégation plaquettaire (**Patrono et coll., 2005**). Ces effets auraient surtout un rôle à court terme dans la prévention secondaire des accidents vasculaires. Mais des effets à plus long terme, antiinflammatoires et antioxydants de l'aspirine pourraient expliquer les bénéfices au cours de la prévention secondaire mais également primaire.

Les molécules pro-inflammatoires sont également pro-oxydantes (**Seibold et coll., 2003**) avec notamment le rôle bien démontré de l'augmentation de la génération de ROS induite par l'augmentation de l'activité de la COX-2 (**Kim et coll., 2000**). NF- κ B est connu pour moduler la transcription de cytokines pro-inflammatoires telles que de le TNF α , des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 et des enzymes inflammatoires iNOS et COX-2 (**Chung et coll., 2002**). Très récemment, Jung et Coll ont montré que l'aspirine à faible dose (5mg/kg/j), donnée pendant 10 jours à des rats permettait de diminuer au niveau du rein, l'activation de NF- κ B, diminuer l'expression des molécules sus-citées et la production de ROS (**Jung et coll., 2006**). La diminution de la production de ROS avait déjà été montrée chez des rats jeunes spontanément hypertendus, à qui de fortes doses d'aspirine avaient été administrées pendant 12 jours permettant une réduction de O₂[•] de 45% au niveau de l'aorte avec en parallèle une amélioration de la relaxation endothélium-dépendante. En revanche, l'administration d'ibuprofène, autre anitnflammatoire et inhibiteur non sélectif des COX chez ces mêmes rats n'avait pas d'action sur la production de O₂[•]. (**Dragomir et coll., 2004** ;

Eisele et coll., 2004 ; Grosser et coll., 2003 ; Taubert et coll., 2004 ; Wu et coll., 2002). Toutefois, ce mécanisme n'est pas le seul. Il a été montré que plus la eNOS était acétylée, plus la synthèse de NO augmentait (**Kalgutkar et coll., 1998, Loll et coll., 2001**). Or l'aspirine permet l'acétylation de la eNOS, augmentant ainsi la synthèse de NO par l'endothélium. L'aspirine diminue les taux de ICAM-1 dans des modèles de souris déficientes en récepteur LDL (**Cyrus et coll., 2002 ; Cyrus et coll., 2006**). Or la réduction des molécules d'adhésion a un effet fonctionnel avec pour conséquence une diminution de l'adhésion monocytaire dans des cellules endothéliales stimulées par des LDL (**Eisele et coll., 2004**).

L'aspirine pourrait donc préserver l'intégrité de la paroi vasculaire grâce à ses propriétés de scavenger de radicaux libres (**El Midaoui et coll., 2002, Podhaisky et coll., 1997**). De plus, des travaux suggèrent que l'aspirine pourrait améliorer la fonction endothéliale. L'amélioration de la relaxation endothélium-dépendante a été montrée chez l'homme après administration d'une forte dose d'aspirine chez des patients présentant une athérosclérose (**Husain et coll., 1998**), et plus récemment, après un traitement de deux mois par faibles doses d'aspirine chez des patients hypercholestérolémiques et hypertendus a permis une amélioration de la fonction endothéliale (**Magen et coll., 2005**) et chez l'animal après administration chronique de fortes doses chez des rats hypertendus (**Wu et coll., 2002**).

En résumé, si des travaux concernant le vieillissement artériel existent, aucun n'allie étude fonctionnelle et histologique à des âges différents de vieillissement. De plus, les études concernant l'amélioration de la fonction endothéliale chez l'animal âgé restent peu nombreuses alors que la dysfonction endothéliale est considérée comme un facteur de risque vasculaire majeur.

5. OBJECTIF DE NOTRE TRAVAIL

Le but de notre travail était de déterminer la possibilité de prévention de la dysfonction endothéliale par de faibles doses d'aspirine dans un modèle murin de vieillissement physiologique. Nous avons décidé de réaliser cette étude chez des souris C57B/6J, souris qui ne développent pas de facteurs de risque d'athérosclérose tels que hypertension artérielle, dyslipidémie, obésité ou diabète au cours leur vieillissement dans des conditions standard

d'hébergement et d'alimentation (<http://www.informatics.jax.org/>). L'étude de la fonction endothéliale a d'abord été réalisée dans des groupes d'animaux d'âge différents (12, 36, 60, 84 semaines).

Ce préalable nous a permis d'effectuer un parallèle entre nos résultats et ceux de la littérature où le rat est souvent le modèle expérimental et de déterminer les âges auxquels nous pourrions traiter les animaux dans le but de préserver la fonction endothéliale ou de la rétablir.

L'aspirine à faible dose a été la molécule retenue en raison de ses effets reconnus chez l'homme et de sa très large utilisation en prévention des événements vasculaires et de certaines de ses propriétés nouvellement décrites : diminution du stress oxydant et amélioration de la fonction endothéliale dans des modèles d'athérosclérose ou à risque d'athérosclérose. L'effet de 8 semaines de traitement par aspirine initié chez des animaux âgés de 60 semaines et l'effet de 16 semaines initiés chez des animaux âgés de 60 et 96 semaines ont été étudiés. L'effet de faibles doses d'aspirine a alors été étudié chez des animaux de 68, 76, et 112 semaines. Les changements structuraux secondaires à l'âge et l'aspirine ont également été déterminés sur des coupes d'aorte. Enfin les effets de faibles doses d'aspirine sur les marqueurs oxydatifs ont été quantifiés.

6. MATERIELS ET METHODES

6.1. Animaux

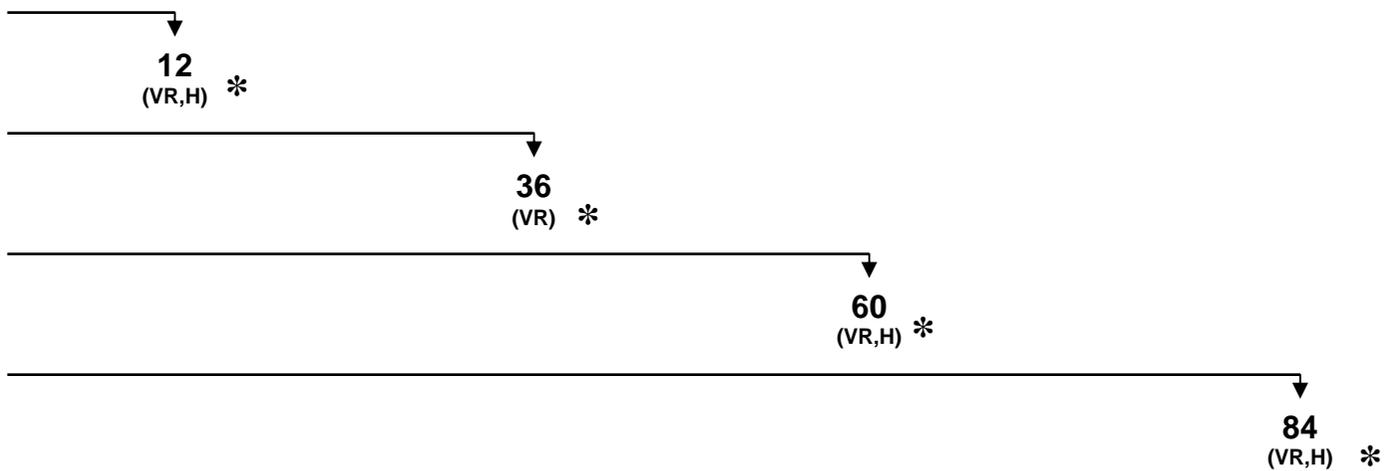
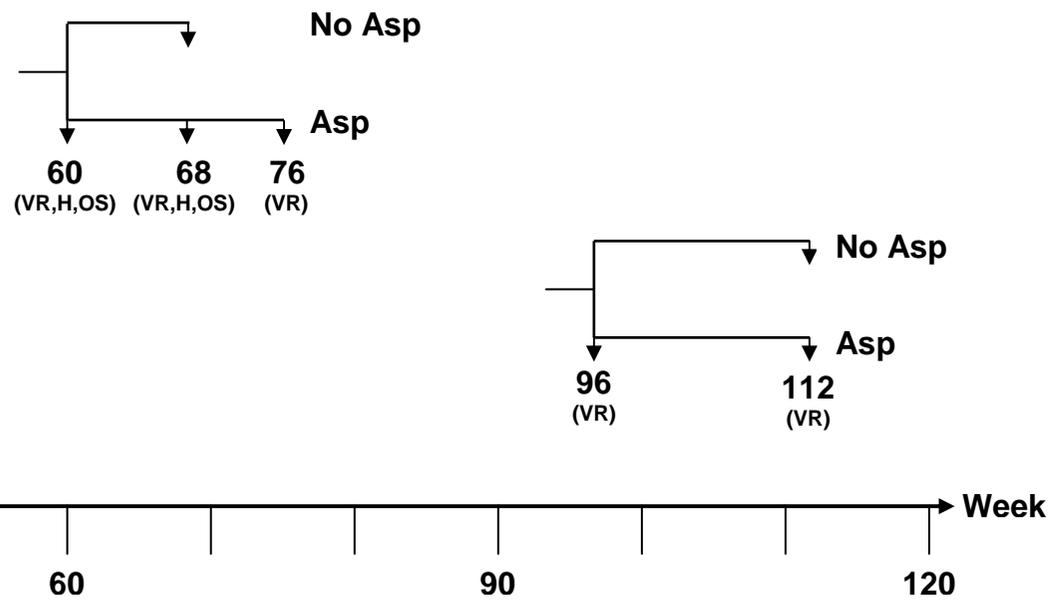
Toutes les manipulations animales ont été conduites conformément aux recommandations internationales concernant l'utilisation des animaux d'expérimentation. Les souris C57BL/6 males ont été obtenues des Laboratoires Janvier (Mayenne, France). Les animaux ont été hébergés à l'animalerie de la faculté de Médecine de Lille à raison de 5 animaux par cage. Les conditions ambiantes étaient contrôlées : température de l'air de 21 à 23°C, taux d'humidité de 50 à 60% et alternance jour/nuit de 12 heures. Les animaux bénéficiaient d'un accès libre à l'eau et à la nourriture, composée de granulés standards. Toutes les souris ont bénéficié d'une période d'acclimatation de 2 semaines avant de débiter les protocoles d'expérimentation.

6.2. Protocoles (figure 5)

Dans un premier temps, l'étude de la fonction endothéliale a été réalisée dans des groupes d'animaux d'âge différents non traités par aspirine. L'étude de la fonction endothéliale de l'aorte thoracique descendante a été étudiée à 4 âges différents, 12, 36, 60 et 84 semaines, constituant respectivement les groupes 12, 36, 60 et 84 semaines. L'étude anatomopathologique de la paroi aortique a été réalisée dans les groupes 12, 60 et 84 semaines (figure 5A).

Dans un second temps, l'effet de 8 semaines de traitement par aspirine initié chez des animaux âgés de 60 semaines et l'effet de 16 semaines initiés chez des animaux âgés de 60 et 96 semaines ont été étudiés. L'effet de faibles doses d'aspirine a alors été étudié chez des animaux de 68, 76, et 112 semaines (figure 5B). Pour cela, les animaux ont été randomisés en deux groupes : le groupe « No Asp » qui ne recevait pas d'aspirine dans l'eau de boisson et le groupe « Asp » qui recevait de l'aspirine dans l'eau de boisson (30µg/ml : UPSA, Paris, France). Les eaux de boissons, avec et sans aspirine ont été renouvelées chaque jour. La stabilité de l'activité salicylate a été testée par fluorescent polarisation immune assay 48 heures après mélange de l'aspirine à l'eau de boisson (AxSYM, Abbott, Abbott Park, IL). Les résultats montrent que l'activité salicylate reste stable avec 13,3% de variation maximale après 48 heures (n=4). Avant l'étude, nous avons établi que chaque animal buvait en moyenne 3 à 4 ml d'eau par jour, volume d'eau mesuré et en accord avec la littérature (**Cyrus et coll., 2002**).

Considérant qu'une souris C57B/6J mâle pèse environ 30g et boit 3 à 4 ml/jour, chaque animal a reçu dans le groupe « Asp » 90 à 120 µg d'aspirine par jour. Cette faible posologie d'aspirine a été administrée de telle sorte à obtenir une posologie identique à celle décrite en pratique clinique. Pour chaque groupe, 6 animaux ont été randomisés pour l'étude de la fonction endothéliale, 8 pour l'étude anatomopathologique, 5 pour l'étude du stress oxydant et 5 pour le westernblot.

A**B**

VR : vasorelaxation, H : histomorphométrie, OS : stress oxydant

Figure 5. Design de l'étude

6.3. Vasoréactivité aortique

Pour évaluer les effets de l'âge sur la fonction endothéliale, la réponse endothéliale à l'acétylcholine des segments aortiques précontractés à la phényléphrine a été étudiée chez des souris de 12, 36, 60 et 84 semaines d'âge, alors que l'effet du traitement par faibles doses d'aspirine après une période de 8 ou 16 semaines a été étudiée chez des souris de 68, 76 et 112 semaines.

6.3.1. Prélèvements

Après une anesthésie profonde induite par une injection intrapéritonéale de 0,3ml de pentobarbital à 6% (Ceva Santé animal, Libourne, France), une incision sous diaphragmatique transversale et une thoracotomie bilatérale étaient réalisées. Puis l'aorte thoracique était prélevée cœur battant et immédiatement plongée dans une solution de Krebs (en mM/l) : NaCl 118 ; KCl 4.6 ; NaHCO₃ 27.2 ; MgSO₄ 1.2 ; KH₂PO₄ 1.2 ; CaCL₂ 1.75 ; Na₂ EDTA 0,026, d-glucose 11.1, de pH compris entre 7.35 et 7.40 et oxygénée (O₂ 95% et CO₂ 5% ; Air Liquide Santé™).

6.3.2. Préparation des anneaux aortiques

Après avoir rapidement purgé le contenu de la lumière artérielle avec la solution de Krebs, une dissection minutieuse sous stéréomicroscope (Stemi 200-C, Zeiss™) permettait de séparer le segment artériel de son tissu conjonctivo-graisseux. Deux anneaux de 3 à 4 mm de longueur étaient coupés à partir de la partie proximale de l'aorte thoracique.

6.3.3. Installation des anneaux

Chaque anneau était ensuite monté entre deux étriers métalliques passés à travers la lumière vasculaire puis suspendu de manière aléatoire dans une chambre des 4 chambres d'organe (Radnoti™ Glass Technology, Monrovia, CA, USA) contenant 20 ml de solution de Krebs chauffée à 37°C et oxygénée (O₂ 95% et CO₂ 5%). L'étrier inférieur était fixe ; le supérieur mobile et relié à un transducteur de force (Radnoti™). Les transducteurs étaient connectés à une carte informatique (Flash 12™, Strawberry Tree Incorporated) permettant la

transformation et l'amplification des signaux analogiques en signaux digitaux. Ceux-ci étaient convertis en gramme de tension et visualisés en temps réel sous forme de courbes sur un écran grâce à un logiciel d'acquisition (Workbench PC® Strawberry Tree Incorporated) et de contrôle des données (enregistrement toutes les 10 s) (figure 6).

6.3.4. Protocole d'étude de la vasoréactivité

Une fois installés, les segments artériels étaient progressivement étirés en 20 à 40 minutes jusqu'à obtenir une tension de repos optimale ou resting level (RL). Cette tension de repos a été préalablement définie à 1.5 g et correspond à la tension de base permettant une contraction maximale en réponse à une solution de KCl 3mM. Ensuite ces segments artériels étaient stabilisés pendant 60 min au RL. Une contraction initiale était obtenue par administration d'une solution dépolarisante de KCl à 10^{-3} M qui permettait de vérifier la viabilité de l'anneau. Chaque cuve était alors rincée 3 fois de suite avec la solution de Krebs. La tension de chaque anneau était ensuite ramenée au RL et maintenue pendant 30 min. Les anneaux étaient alors exposés à des doses croissantes de phényléphrine, agent contractant récepteur-dépendant (10^{-9} à $3 \cdot 10^{-4}$ M) pour établir une courbe dose/réponse en contraction. Pour chaque concentration de phényléphrine, un plateau de contraction était attendu avant de passer à la concentration supérieure. Après obtention d'un plateau de contraction maximale, des doses croissantes d'acétylcholine (10^{-9} à $3 \cdot 10^{-5}$ M), agent relaxant endothélium-dépendant récepteur-dépendant, étaient administrées pour tester la relaxation endothélium-dépendante (figure 7). Après rinçage abondant et stabilisation de la tension de l'anneau au RL pendant 30 min, une seconde contraction du segment était obtenue avec une dose unique de phényléphrine à $3 \cdot 10^{-6}$. La relaxation endothélium-indépendante était étudiée par l'application de doses croissantes de nitroprussiate de sodium (10^{-9} à $3 \cdot 10^{-5}$ M).

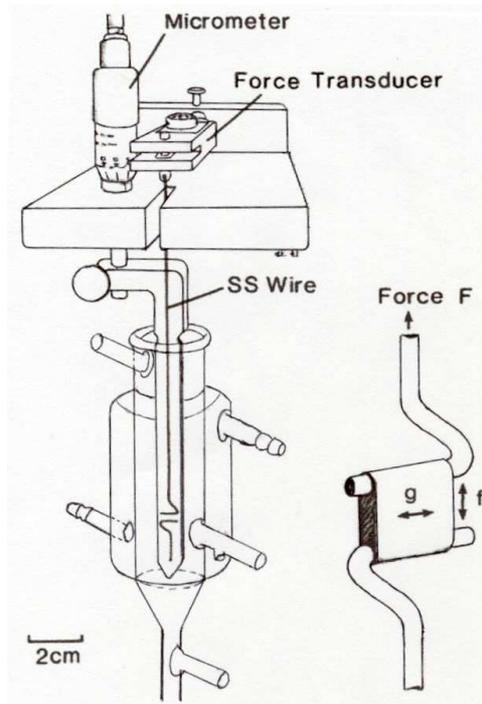


Figure 6 : Schéma d'une chambre d'organe isolé

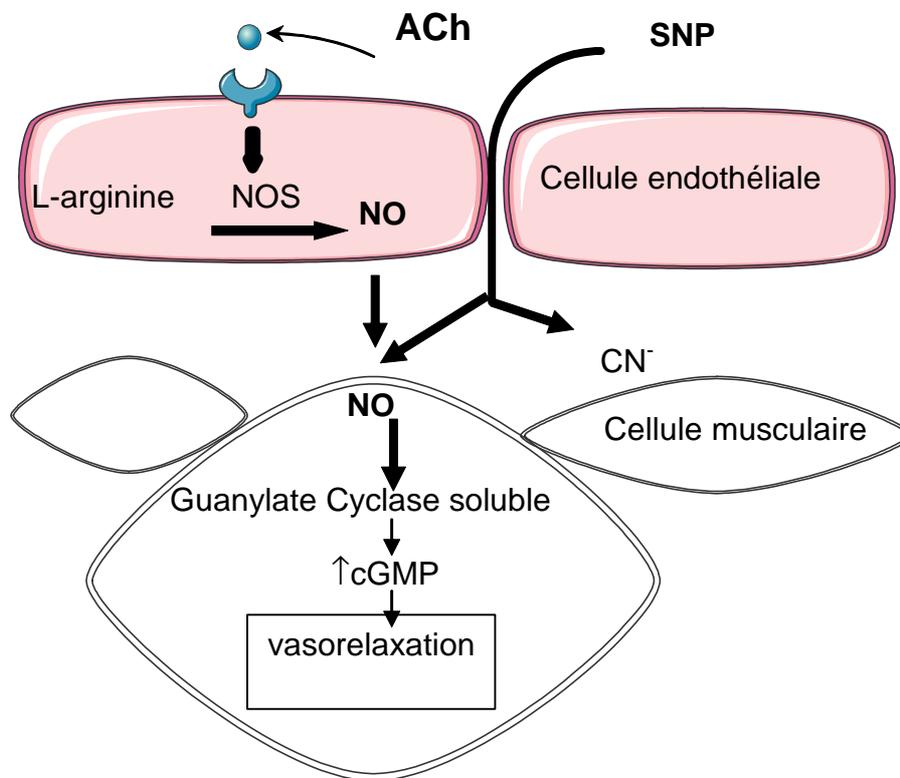


Figure 7. Mode d'action de l'acétylcholine

6.4. Etude anatomopathologique de l'aorte

6.4.1. Prélèvements

Après une anesthésie profonde induite par une injection intrapéritonéale de 0,3ml de pentobarbital à 6% (Ceva Santé animal, Libourne, France), une incision sous diaphragmatique transversale et une thoracotomie bilatérale étaient réalisées.

Après le sacrifice, le cœur était perfusé par du sérum physiologique hépariné (héparine choay[®] 5000 UI/l). La crosse aortique et l'aorte thoracique étaient prélevées après décoloration des organes et coupée, transversalement, en trois parties: crosse aortique, elle-même coupée en 2, aorte médiane et aorte distale. La moitié de la crosse aortique et l'aorte thoracique étaient plongées immédiatement, pour fixation, dans une solution de formol diluée à 4 %. Le temps de fixation était au minimum de 48 heures. Après déshydratation et enrobage dans un automate (TP 1050 LEICA[®]), les échantillons étaient inclus en paraffine (Paraplast[®]). La deuxième moitié de la crosse aortique était congelée à -80°C et destinée à l'étude de VCAM-1 en immunohistochimie.

6.4.2. Les coupes

Deux types de coupes ont été réalisés, l'un pour la technique sur paraffine, l'autre pour la technique en congélation.

- Coupes en paraffine : Des coupes de 4 µm d'épaisseur ont été effectuées sur un microtome LEICA[®] RM 2135, Wetzlar, Germany. Elles ont été étalées sur un bain d'eau distillée additionnée de Stick-on chauffé à 37°, étalées sur des lames super-Frost[®] puis mises à sécher au four micro ondes pendant 10mn à 250 watts.
- Coupes en congélation : sur une platine porte objet, du tissue-tek[®] (Diagnostics division) a été déposé dans lequel le prélèvement a été placé. Des coupes de 6µm ont été effectuées sur un microtome LEICA CM1900[®] et ont été étalées sur des lames puis fixées à l'acétone à -20°C.

On a réalisé 2 coupes pour chaque coloration histochimique et chaque immunomarquage.

Par souris ont été réalisées 2 lames pour chacun des 3 niveaux de coupe, pour chaque coloration et immuno-marquage.

L'étude s'est faite avec un microscope (LeicaDMR_BWetzlar, Germany) couplé à une caméra vidéo couleur 3CCCD (Power HAD, SONY, Sherwood, Dallas, TX). Les analyses quantitatives ont été réalisées avec un système d'analyse d'images (Q-Win, Leica, Rueil-Malmaison, France).

Pour chaque coloration et chaque étude morphométrique, deux sections par segment étudié ont été analysées en aveugle par deux anatomopathologistes. Une analyse quantitative a été réalisée utilisant le système d'analyse d'image Q-Win.

6.4.3. Etude morphométrique

Pour l'étude du vieillissement artériel physiologique, pour chaque aorte étudiée, 3 segments, segment crosse aortique, segment aorte médiane, segment aorte distale, ont été prélevés.

Pour l'étude de l'effet de l'aspirine sur la dysfonction endothéliale, seule la crosse aortique a été étudiée, car la crosse aortique était sur les études histologiques, le segment subissant les plus importantes modifications avec l'avancée en âge.

Pour chaque segment, l'épaisseur maximale et minimale de la média et de l'intima ont été mesurées ; l'épaisseur considérée étant la moyenne mathématique de ces valeurs (épaisseur intima-média).

6.4.4. Les colorations standards et histochimiques

Les colorations ont été effectuées après déparaffinage au xylène et réhydratation.

6.4.4.a. Coloration hématoéine, érythroéine, safran (HES)

Réalisation

Sur automate Autostainer XL LEICA®

Protocole

hématoéine 1mn 55 – rinçage à l'eau - HCL 1% dans alcool 50°C – rinçage à l'eau- eau ammoniacuée – rinçage à l'eau – érythroéine 2mn30 – rinçage à l'eau – alcool absolu – safran 30 secondes – déshydratation et montage à l'Eukitt®.

Résultats

Les noyaux sont colorés en bleu par l'hématoéine, les cytoplasmes en rose par l'érythroéine et le tissu conjonctif en jaune par le safran.

6.4.4.b. Coloration à l'Orcéine

Réalisation : manuelle

Protocole : alcool à 95°C 20mn - orcéine 20mn - bain d'alcool à 95° - vert lumière quelques secondes - déshydratation et montage à l'Eukitt®

Résultats : coloration des fibres élastiques en noir.

6.4.4.c. Coloration au Bleu Alcian (pH 2.3)

Réalisation : manuelle

Protocole: bleu alcian pH 2.3 10mn (Solution de 0.5 g de bleu alcian dans 50 ml d'eau distillée avec 1 ml d'acide acétique. QSP 100 ml eau distillée - ajuster le pH) – rinçage à l'eau - Kernetrot 1mn – rinçage à l'eau - montage à l'Eukitt®.

Résultats: Mucopolysaccharides acides en bleu

6.4.4.d. Coloration de Volgens-Gomori

Réalisation: Manuelle

Protocole : permanganate de potassium 1% 5mn – rinçage à l'eau - métabisulfite de potassium 3% 3mn – rinçage à l'eau – alun de fer 2% 1mn – rinçage à l'eau - complexe argent 1mn – rinçage à l'eau - formol 10% - rinçage à l'eau - chlorure d'or 0.2% 15mn – rinçage à l'eau - rouge noyau 5mn – rinçage à l'eau – déshydratation - montage à l'Eukitt®.

Résultats : réticuline (collagène de type III) en noir; noyaux en rouge.

6.4.4.e. Coloration au Rouge Sirius

Réalisation : manuelle

Protocole : picrosirius 90mn – rinçage à l'eau - hématoïne 1mn – rinçage à l'eau
Déshydratation montage à l'Eukitt®.

Résultats : collagène de type I et réticuline en rouge, noyaux en bleu.

6.4.5. Techniques immunohistochimiques

6.4.5.a. Principe général

Les techniques d'immunohistochimie permettent la mise en évidence spécifique de constituants tissulaires sur des coupes histologiques. L'anticorps dit primaire est dirigé contre

ce constituant cellulaire particulier. La révélation de cette fixation se réalise par l'utilisation d'un anticorps secondaire fluorescent ou d'un anticorps secondaire marqué à la peroxydase ou encore un anticorps secondaire biotinylé coloré par la streptavidine-DAB.

Les anticorps primaires utilisés ont été l'anticorps anti actine lisse (DAKO[®] MO8851), anticorps Anti Prolifering Cell Nuclear Antigen (PCNA), anticorps anti AGEs, anticorps anti VCAM-1.

6.4.5.b. Anti actine lisse (DAKO[®] MO8851)

Anticorps monoclonal de souris anti-humain.

Réalisation : automatique

Protocole : passage des lames super-Frost[®] dans l'automate VENTANA-NEXES[®].

Les étapes techniques sont:

- view inhibitor (ventana) 4mn - application manuelle de l'anticorps primaire anti actine lisse 20mn – rinçage à l'eau distillée
- view – biotine (ventana) –rinçage à l'eau distillée
- view streptavidine – horse raddish peroxydase (HRP) (ventana)
- view diamino benzidine (ventana)
- view H₂O₂ 8mn
- view copper (ventana) 4mn – rinçage à l'eau –hématoxyline 4mn - bluing reagent 4mn – rinçage à l'eau – déshydratation - montage à l'Eukitt[®].

Résultats : filaments d'actine lisse en brun dans les cellules musculaires, les myofibroblastes, les cellules myoépithéliales.

6.4.5.c. Anticorps Anti Prolifering Cell Nuclear Antigen (PCNA)

Afin d'étudier l'existence d'une prolifération de noyaux cellulaires, on utilise une technique d'immunohistochimie avec anticorps PCNA.

Le PCNA est une protéine auxiliaire de la DNA polymérase δ , synthétisée pendant la phase G1 et maximale en phase S mais très faible dans les cellules quiescentes. Son marquage est nucléaire mais peut être aussi cytoplasmique.

Anticorps monoclonal prédilué de souris, clone PC10 (DAKO[®])

Protocole : passage des lames Super-Frost dans l'automate VENTANA-NEXES[®].

Les étapes techniques sont identiques à celle de l'étude de l'actine avec application manuelle de l'anticorps primaire 20mn

Résultats : marquage des noyaux et/ou du cytoplasme des cellules prolifératives chez tous les vertébrés, en brun.

6.4.5.d. Anticorps anti AGEs (Yamagishi et coll., 2003)

Cet anticorps a été fourni gracieusement par le laboratoire du Pr Wautier (Institut National de la Transfusion Sanguine CHU Lariboisière Paris).

L'anticorps primaire est un anti AGEs obtenu par immunisation chez la poule par RNAse - AGEs dilution 1/100^e. L'anticorps secondaire est un anticorps de lapin anti-poulet conjugué à la peroxydase (Laboratoire Jackson ImmunoResearch[®]).

Protocole : technique manuelle, pré traitement au micro-ondes 20mn (350watts) dans un tampon citrate pH6 - rinçage PBS - H₂O₂ (1% dans methanol) 30mn - rinçage tampon PBS - anticorps de poulet anti AGE primaire dilué au 1/100^e une nuit à température ambiante - rinçage PBS - anticorps secondaire de lapin anti-poulet marqué à la peroxydase dilution 1/500^e à température ambiante durant 1 heure - rinçage PBS - marquage à la peroxydase 1h - révélation kit ARK DAKO[®] - hématoxyline 2mn - montage à l'Eukitt[®].

La technique a été effectuée en 2 manipulations avec comme lames témoin un rein de souris diabétique.

Résultats : marquage de la protéine pontée par les AGEs extracellulaires et nucléaires en brun

6.4.5.e. Anticorps anti Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1)

L'étude de VCAM 1 en immunohistochimie a été réalisée sur :

- coupes en paraffine pour l'étude du vieillissement artériel
- coupes congelées pour l'étude de l'action de l'aspirine à faible dose sur le vieillissement artériel

Sérum de chèvre polyclonal, clone-19, TEBU[®]. Cet anticorps peut être utilisé chez l'homme, la souris et le rat (Santa Cruz Biotechnology[®]).

Réalisation : technique manuelle

Protocole : perméabilisation : PBS à 0.3% de triton 100X 1 heure rinçage PBS 2 fois 5mn, puis 1 fois 10mn - blocage des peroxydases dans H₂O₂ 3% 10mn préparer PBS à 10% de sérum bloquant de chèvre (kit ABC VECTASTAIN[®] Elite) - incuber 1 heure à température ambiante - rinçage PBS 4 fois - incuber les lames une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire VCAM-1 dilué au 1/80e dans du PBS à 0.2% de TWEEN et 5% de sérum bloquant du kit - rinçage PBS à 0,02% TWEEN 20 - incubation dans l'anticorps secondaire 3 heures à température ambiante (anticorps secondaire anti-chèvre biotinylé au 1/100e) - rinçage PBS 0,02% TWEEN 20 3 fois - rinçages PBS 2 fois - marquage à la streptavidine biotine (kit Elite[®]) 1 heure à température ambiante - 3 rinçages 10mn de PBS - révélation au DAB[®] 5mn - hématoxyline 2mn - montage à l'Eukitt[®].

Résultats : marquage en brun de VCAM-1.

L'interprétation de l'immunomarquage avec anticorps anti VCAM-1 a été effectuée avec des lames témoin positif d'aortes de souris ayant reçu 12 heures auparavant une injection de LPS (4mg/kg en injection intra péritonéale).

6.4.6. Analyse en Western-Blot de l'expression de RAGE

6.4.6.a. Extraction des protéines

L'extraction des protéines était réalisée par broyage de l'aorte congelée avec un pilon et un mortier puis la poudre obtenue était mélangée à du tampon RIPA (1 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 1 % DOC, 0.1 % SDS, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.25 et du PMSF 1mM) associé à des inhibiteurs de protéases et du SDS, puis sonification de la solution obtenue (Sonifier 150, BRANSON).

6.4.6.b. Dosage des protéines

Le dosage des protéines était réalisé par la méthode de Peterson. Les prélèvements étaient aliquotés pour des dépôts de 25µg de protéines et conservés à -80°C.

6.4.6.c. Western-Blot

Les prélèvements étaient déposés dans un gel de SDS-PAGE à 10% d'acrylamide, après dénaturation par du β mercapto-éthanol et chauffage à 95°C pendant 5 minutes.

Après migration des protéines selon leur poids moléculaire dans un tampon de migration (25mM Tris, 192mM Glycine, 0.1% SDS pH 8.3) à 180V pendant 1 heure, elles étaient transférées sur une membrane de nitrocellulose ECL (Amersham) dans un semi-dry blotter à

10V pendant 2h, avec un tampon de transfert (100ml de 25mM Tris/192mM Glycine/pH 8.3, 200ml éthanol, 700ml d'eau désionisée).

Les protéines étaient révélées par un bain de rouge Ponceau, puis les membranes étaient découpées en 4 bandes selon leur poids moléculaire avec l'aide du témoin de masse (Bio-rad), puis rincées dans du PBS. Les membranes étaient ensuite immergées pendant 30 minutes dans du lait à 5%.

Une incubation avec l'anticorps primaire dilué dans du lait à 5% était réalisée sur la nuit à 4°C.

Après un lavage dans du PBS (3*15 minutes) puis un blocage dans du lait à 5%, l'anticorps secondaire (anticorps anti IgG conjugué à de la peroxydase de radis noir (horse raddish peroxydase : HRP)) était déposé et laissé à incuber 3 heures.

Après rinçage dans du PBS (5*10 minutes), la révélation était réalisée par dépôt d'ECL puis exposition sur film (Hyperfilm ECL) en chambre noire.

6.4.6.d. Analyse comparative des protéines

L'analyse comparative des protéines était effectuée à l'aide du logiciel PerfectImage v7.1, après numérisation des films sur scanner AGFA. Les résultats étaient exprimés en unités arbitraires, sous forme de ratio par rapport à l'expression d'actine.

6.4.6.e. Anticorps

Anticorps primaires :

-Anti-RAGE : rabbit polyclonal IgG ab3611 (Abcam Ltd, Cambridge, UK)

-Anti-VCAM-1 : goat anti-human vascular cellular adhesion molecule (VCAM)-1 IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Californie)

-Anti-Actine : rabbit universal polyclonal IgG (Sigma)

-

Anticorps secondaires:

-Anti-goat : rabbit anti-goat HRP-conjugated IgG PI-9500 (Vector Labs)

6.5. Etude du stress oxydant

6.5.1. Prélèvements

Après étirement de la moelle épinière, mais cœur battant, le sang est collecté par aspiration intracardiaque puis l'aorte thoracique est délicatement disséquée. Le cœur, le foie, les poumons et les reins sont prélevés, plongés dans l'azote liquide et congelés à -80° . Tous les dosages ont été effectués simultanément.

6.5.2. Détermination des concentrations de malondialdéhyde MDA

Le MDA est largement utilisé comme marqueur de la peroxydation lipidique.

La détermination des concentrations de MDA s'est faite par chromatographie liquide haute performance (HPLC).

Deux cents microlitres d'homogénats aortiques sont mixés avec 2 mL de 0,1 M HCl, extraits avec 2×3 mL d'acétate d'éthyle, agités dans un vortex pendant 5 minutes, puis centrifugés à 3,000 g pendant 10 min. Après évaporation, les échantillons sont mélangés dans 200 μ L de méthanol. Le système HPLC se compose d'une pompe Jasco PU-980 équipée d'une colonne Nucléosil (C18, 150×4.6 mm, de granulométrie 5- μ m, un injecteur automatisé Rheodyne 7725, un détecteur UV Jasco 975 et un intégrateur Shimadzu CR3A (Vasse Industries, Lille, France)). La phase mobile est composée du mélange 50 mM KH_2PO_4 -méthanol 60:40 (v/v), le pH est de 6.8 ajusté avec 1 M KOH. La quantité de MDA dans l'échantillon est obtenue grâce à une courbe standard réalisée avec du tétraméthoxypropane (Sigma-Aldrich), l'acide thiobarbiturique (TBA) étant utilisé comme réactif. Un volume de 50 μ L de solution standard ou d'échantillon est injecté dans le système HPLC et le produit MDA-TBA est détecté à 532 nm (**Garçon et coll., 2001a**).

6.5.3. Détermination de l'activité SOD

L'activité totale de la SOD est réalisée à l'aide du kit réactif RANSOD (Randox Laboratories, Montpellier-Frejorgues, France) (**Garçon et al., 2001a**).

6.5.4. Détermination des concentrations de 8-OHdG

La formation du 8-OHdG est utilisée comme indicateur du stress oxydant au sein du DNA. La détermination des concentrations de 8-OHdG permet d'estimer les lésions induites par le radical oxygène (**Hwang et coll., 2007 ; Loft et coll., 1998 ; Marnett, 2000**). Les concentrations de 8-OHdG sont déterminées par une méthode initialement décrite par

Toyokuni et coll. et modifiée par Garçon et coll., (**Toyokuni et coll., 1997 et modifiée par Garçon et coll., 2001b**). L'ADN est extrait des tissus (DNeasyTissue Kit, Qiagen, Courtaboeuf, France) et incubé à 100° pendant 2 min puis mélangé à 1 µL de 250 mM de solution d'acétate de potassium (pH 5.4), 1 µL of 10 mM de sulfate de zinc, et 2 µL de P1 nucléase (6.25 U/µL; Sigma-Aldrich), et incubé une nuit à 37°C. La solution est alors mélangée avec 2 µL of 0.5 M Tris-HCl (pH 8.3) et 2 µL de phosphatase alcaline (0.31 U/µL; Sigma-Aldrich), et est incubé pendant 2 heures à 37°C. Les concentrations de 8-OHdG sont déterminés à l'aide du kit 8-OHdG ELISA (Japan Institute for the Control of Aging, Haruoka, Japan).

6.5.5. Détermination du statut en glutathion

Le glutathion total (GSH + GSSG) et le glutathion disulfure (GSSG) sont dosés en utilisant le 5,5-dithio-bis (2nitrobenzoic acid) et la glutathione réductase, comme déjà publié par Foucaud et coll. (2006).

6.5.6. Détermination des concentrations de TNF-α

Les concentrations de TNF-α sont mesurées en utilisant une technique enzymatique immunoassay commercialisée (Quantikine Mouse TNF-α Immunoassay, R&D Systems Europe, Abingdon, United Kingdom), selon les recommandations de la firme commerciale.

6.5.7. Détermination des concentrations de NO

Les concentrations totales de NO sont dosées par la réaction de Griess après conversion enzymatique de nitrate en nitrite par la nitrate réductase (Total Nitric Oxide Assay, R&D Systems Europe, Abingdon, United Kingdom).

6.5.8. Détermination de la concentration protéique tissulaire

La concentration protéique tissulaire est déterminée par le reagent bicinchoninic (Pierce IL) (**Smith et coll., 1985**).

6.6. Dosages biologiques

6.6.1. Dosages plasmatiques des AGEs

Le dosage des AGEs plasmatiques a été effectué dans le laboratoire du Pr Wautier (Institut National de la Transfusion Sanguine, Paris).

Les principales étapes de ce dosage sont :

- Préparation des protéines glyquées : incubation à l'obscurité, à 37°C durant 60 jours de serum albumine humaine avec une solution de glucose.
- Obtention d'anticorps polyclonaux anti AGEs après injections répétées de la solution précédente à des poules : IgY préparée par précipitation différentielle au polyéthylène-glycol puis purifiée par un traitement cryogénique et par l'alcool.
- Mesure des AGEs par méthode ELISA compétitive : résultats exprimés en % de densité optique (rapport de densité optique sur densité optique étalon). Conversion des unités en µg/ml.

6.6.2. Dosage de la glycémie

La glycémie a été obtenue après prélèvement caudal à l'aide d'un lecteur de glycémie OneTouch[®] ultra (Lifescan, Milpitas, CA 95035 USA).

6.6.3. Dosage du cholestérol

Le dosage du cholestérol total et des triglycérides s'est fait par une méthode colorimétrique. Le plasma était obtenu à partir du sang recueilli lors de la ponction intracardiaque sur tube hépariné et centrifugé 30 minutes à 4°C 3500 tours/minutes.

15 µl de plasma de chaque souris était dilué dans 285 µl de NaCl 9%. 50 µl de cette solution était déposée en binôme sur deux microplaques. 100µl de réactif cholestérol RTU (Biomérieux[®]) et 100 µl de réactif Triglycérides PAP 1000 (Biomérieux[®]) étaient déposés respectivement dans chacun des puits. Après incubation 30 minutes à 37°C, la lecture des échantillons étaient effectuée par un lecteur de microplaques à 492 nm.

6.7. Etude de l'expression génique du cytochrome cyp 2e1

Pour déterminer la prise effective de l'aspirine à faible dose, l'expression du gène *cyp 2e1* a été évaluée chez les souris du groupe aspirine. Une précédente étude avait montré que l'aspirine et l'acide salicylique induisent l'expression du cytochrome p450 2E1 (*cyp 2e1*) dans le foie des rongeurs (**Damme et coll., 1996**).

Real-time reverse transcription–polymerase-chain reaction (RT–PCR)

Le RNA total était extrait du foie par un mini kit RNeasy (RNeasy Total RNA System, Qiagen, Courtaboeuf, France), selon les instructions de la firme. Pour la synthèse du cDNA, 1 µg de RNA total était mélangé dans un volume final de 19 µL de solution tampon (50 mM Tris–HCl, 40 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol, 0.5% Tween 20 (v/v), 1 mM dNTP, 20 U RNase inhibitor and 100 pmol oligo(dT)15 (Roche Diagnostics, Meylan, France). Après que le mélange ait atteint une température de 42°C, 50 U of Expand™ Reverse Transcriptase (Roche Diagnostics) étaient ajoutés à chaque tube et incubés 60 min à 42°C. La réaction était stoppée par dénaturation de l'enzyme à 95°C pendant 5 min. L'analyse de *cyp 2e1* et de glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) cDNA était réalisée par Power SYBR Green PCR Master Mix Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems France SA, Courtaboeuf, France). Les paires de primers spécifiques et les conditions de PCR thermocycling ont été précédemment décrites par Loeppen et coll. (**Loeppen et coll., 2005**). Les séquences de primers synthétisées (Proligo France SAS, Paris, France) étaient: *cyp 2e1* (sense: 5'-TCC CTA AGT ATC CTC CGT GA-3', antisense: 5'-GTA ATC GAA GCG TTT GTT GA-3'); *gapdh* (sense: 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3', antisense: 5'-50-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'). *Gapdh* était utilisé comme gène housekeeping s'assurer de la qualité du mRNA et compter le nombre de cDNA.

La différence d'expression du mRNA *cyp 2e1* entre group "Asp" et groupe "Non Asp", corrigé par le taux de *gapdh*, était déterminé par l'équation $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$, where $\Delta Ct = Ct_{(cyp2e1)} - Ct_{(gapdh)}$, and $\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct_{(cyp2e1)} - \Delta Ct_{(gapdh)}$ (**Zhang et coll., 2003**).

6.8. Analyse statistique

La valeur « n » indique le nombre d'animaux dans chaque groupe. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± erreur standard à la moyenne (SEM). Pour la vasomotricité les réponses contractiles sont exprimées en pourcentage de la contraction maximale obtenue avec

le KCl. Les réponses vasodilatatrices sont exprimées en pourcentage de la contraction maximale à la phényléphrine. Pour chacune des molécules étudiées (Phe, Ach, SNP), les résultats sont présentés sous forme graphique où chaque point représente la moyenne des valeurs observées à une concentration donnée pour les anneaux aortiques d'un même groupe de souris. La valeur des EC50% est calculée avec l'aide du logiciel GRAPHPAD INPLOT tm (Graphpad software Inc. Version). Les comparaisons de moyenne entre les groupes, hormis pour les paramètres du stress oxydant, ont été effectuées par ANOVA à un facteur (Software: SPSS for Windows , v11.0, Paris France). La comparaison de moyennes des paramètres du stress oxydant a été réalisée par un test de Mann-Whitney U (Software: SPSS for Windows, v10.05, 2000; Paris, France).

7. RÉSULTATS

7.1. Article : Low-dose aspirin prevents age-related endothelial dysfunction in a mouse model of physiological aging. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008;294: 1562-1570

Seuls les résultats non développés dans l'article "Low-dose aspirin prevents age-related endothelial dysfunction in a mouse model of physiological aging". Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008;294: 1562-1570, sont repris ci-dessous.

7.2. Etude histomorphométrique

7.2.1. Effets de l'âge

7.2.1.a. Etude morphométrique

Il existe une augmentation progressive de l'épaisseur aortique de la paroi avec l'âge pour un même segment et ce quel que soit le segment (crosse aortique $p=0,003$, aorte médiane $p=0,004$, aorte distale $p=0,006$). L'augmentation de l'épaisseur de la paroi est plus importante entre 12 et 60 semaines qu'entre 60 et 84 semaines.

Age des souris	12 semaines	60 semaines	84 semaines
Crosse aortique (μm)	52,5 \pm 6,3	77,5 \pm 2,5†	82,5 \pm 14,5†
Aorte proximale (μm)	50 \pm 5	68 \pm 4,5†	75 \pm 19,5†
Aorte distale (μm)	49 \pm 6,5	75 \pm 19,5†	70 \pm 5†

Tableau 1. Epaisseur intima-media en fonction du segment de l'aorte et de l'âge des animaux

L'épaisseur intima-media est la moyenne mathématique des valeurs \pm sem

† $p < 0,05$ significativement différent comparé aux souris âgées de 12 semaines.

7.2.1.b. Colorations standards et histochimiques

- **Souris âgées de 12 semaines**

Sur les plans de coupes transversaux de la crosse aortique, de l'aorte médiane et de l'aorte distale, les endothéliums sont bien préservés et ne montrent pas d'anomalie notable. L'intima ne semble pas (Figure 8 a, d).

La média, bien objectivée sur une coloration par l'Orcéine (Figure 9 a), est constituée de cinq lames élastiques sur les souris étudiées. Ces lames élastiques sont parallèles et d'épaisseur égale et constante.

Sur les coupes colorées au bleu alcian, l'aspect est également régulier, sans altération notable (Figure 10a), sauf à un endroit, au niveau de l'aorte médiane, où il existe une zone très focale, légèrement désorganisée, montrant une perte du parallélisme des lames élastiques, qui présentent à ce niveau des contours moins nets.

Après imprégnation argentique, les fibres de réticuline soulignent les lames élastiques (Figure 11a) sur tout le pourtour vasculaire.

La coloration au rouge sirius objective les fibres de réticuline (collagène de type III) et le collagène de type I. La distribution est homogène sur toute la paroi vasculaire, avec un liseré rouge qui souligne plus densément les lames élastiques (Figure 12a).

La coloration par le trichrome vert de Masson colore en vert le collagène I diffusément et régulièrement réparti. Elle apporte moins d'informations que la coloration précédente.

En conclusion :

Les souris de 12 semaines ne présentent pas d'altération pariétale notable mais, très discrètement les lames élastiques sont focalement désorganisées, et montrent des contours moins nets.

- **Souris âgées de 60 semaines**

L'étude des plans transversaux, comme précédemment, montre des endothéliums préservés (Figure 8 b,e). Il n'y a pas d'altération de l'intima.

Sur la coloration HES et sur la coloration à l'Orcéine, on note 5 à 6 lames élastiques toujours parallèlement organisées. Elles s'écartent focalement légèrement les unes des autres (Figure 8 b,e, 9b). Les anomalies prédominent au niveau de la crosse aortique.

Il existe, sur la coloration HES, une zone focale de clarification de la matrice extracellulaire (Figure 8b).

Sur la coloration à l'Orcéine, focalement, les lames élastiques paraissent plus minces. Elles ont des contours gommés et comportent des zones de diffusion micro-fibrillaire (Figure 9b). Les remaniements de la substance fondamentale sont mieux objectivés au bleu alcian avec des dépôts plus intensément colorés en bleu (Figure 10b). Ces flaques très positives restent néanmoins limitées, focales et accolées, lorsqu'elles existent, aux lames élastiques.

La coloration de Volgens-Gomori retrouve un réseau réticulinique plus dissocié, moins régulier. Il souligne moins nettement le contour des lames élastiques, il s'effiloche. Ceci se retrouve surtout dans les zones citées ci-dessus (Figure 11b).

Le rouge sirius donne des informations identiques. Il s'effiloche dans la substance fondamentale en petites fibres perpendiculaires aux lames élastiques (Figure 12b).

En conclusion :

A 60 semaines on observe des modifications de l'architecture pariétale vasculaire prédominant au niveau de la crosse aortique:

- altérations focales des lames élastiques qui s'écartent les unes des autres, s'amincissent, prennent un aspect plus gommé et micro-fibrillaire.

- altérations focales de la matrice extra-cellulaire qui est plus alcianophile que chez les souris de 12 semaines. Elles traduisent une plus grande abondance de protéoglycanes.

- désorganisation du collagène de type I et du réseau réticulinique (collagène de type III).

- **Souris âgées de 84 semaines**

L'endothélium est préservé sur les trois plans de coupes transversaux (Figure 8 c,f). sur un échantillon, l'endothélium est interrompu par un bourgeon conjonctif qui épaissit l'intima dans cette zone et désorganise la première lame élastique. Ailleurs l'intima n'apparaît pas épaissie.

Les lames élastiques sont focalement désorganisées, ceci est bien objectivé sur la coloration à l'orcéine. Elles sont amincies, voire fragmentées, parfois dédoublées. En certaines zones elles s'anastomosent. Elles présentent parfois un aspect gommé et plus nettement fibrillaire que dans le groupe précédent. Sur la coloration standard, la substance extra-cellulaire est modifiée, clarifiée (Figure 9c).

Les altérations de la substance fondamentale sont mieux objectivées sur la coloration au bleu alcian, qui montre des plaques très alcianophiles (protéoglycanes) sur tout le pourtour vasculaire. Ces altérations prédominent dans le tiers interne de la média (Figure 10c). Assez souvent, les zones alcianophiles soulignent les lames élastiques. Ces lésions restent focales et n'atteignent pas le vaisseau sur toute sa circonférence. Elles prédominent au niveau de la crosse aortique mais existent aussi au niveau de l'aorte médiane et distale.

Le réseau réticulinique, sur tout le pourtour vasculaire, montre des altérations plus importantes que dans le groupe précédent. Les fibres s'agencent nettement perpendiculairement aux lames élastiques (Figure 11c).

Le rouge sirius diffuse entre les lames élastiques, en flaques (Figure 12c).

En conclusion :

Il existe une nette désorganisation pariétale, plurifocale, plus étendue à tous les étages de l'aorte mais prédominant au niveau de la crosse aortique. On note une interruption de l'endothélium par un bourgeon conjonctif dans un cas.

- Les lames élastiques sont altérées : dédoublement, fusion, fragmentation, désorganisation, aspect gommé, aspect micro-fibrillaire.
- La substance fondamentale est modifiée beaucoup plus alcianophile en larges flaques ou le long des lames élastiques au niveau du tiers interne de la média.
- Le réseau de collagène et le réseau réticulinique sont désorganisés.

7.2.1.c. Etudes immuno-histochimiques

Elles ont été effectuées sur les plans de coupe transversaux de la crosse aortique, ce niveau ayant été repéré comme le plus altéré sur les colorations standards et histochimiques.

a. Immunomarquage avec un immun sérum anti actine lisse

- **Souris âgées de 12 semaines**

L'immuno-marquage est très positif au niveau de la média dans son ensemble, pour toutes les souris. Seules quelques petites zones sont légèrement moins marquées (Figure 13 a,e).

- **Souris âgées de 60 semaines**

Le marquage est plus inhomogène avec des zones plus ou moins marquées sur tout le pourtour du vaisseau (Figure 13 b,f).

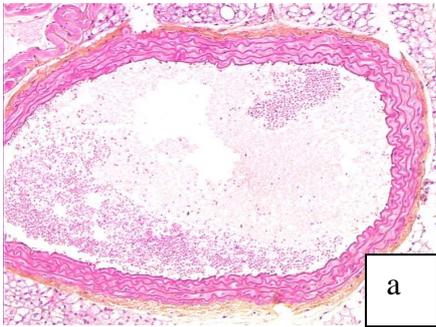
- **Souris âgées de 84 semaines**

On observe une importante diminution du marquage au niveau de la média. Elle ne persiste que focalement (Figure 13 c,g).

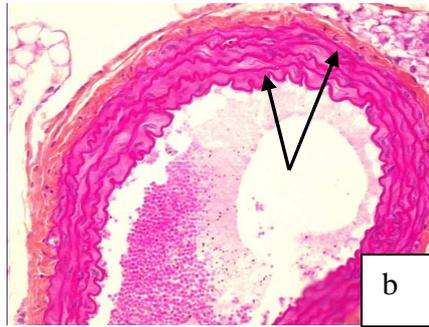
En conclusion :

- le marquage anti actine lisse est intense et diffus au niveau de la média chez les souris âgées de 12 semaines.
- le marquage est hétérogène, avec des zones moins intenses, inégalement réparties au niveau de la média chez les souris âgées de 60 semaines.
- chez les souris âgées de 84 semaines, le marquage est encore moins intense, toujours hétérogène de façon diffuse surtout dans les zones remaniées de la média repérées sur les colorations standards et histochimiques. Plus la souris vieillit, moins la charge d'actine est importante et plus elle est désorganisée.

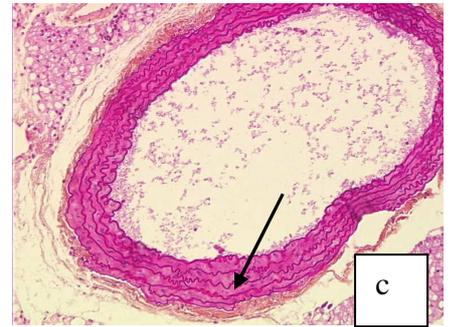
COLORATION H.E.S (figure 8)



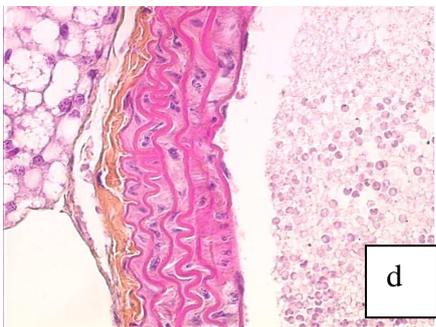
12 sem x25



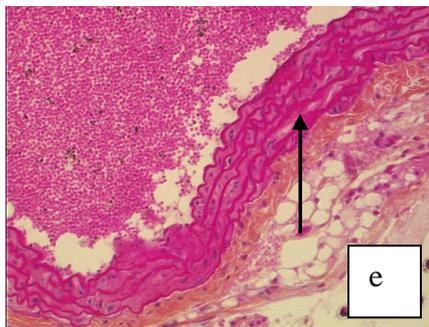
60 sem x25



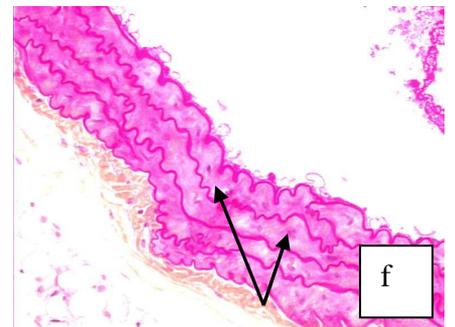
84 sem x25



12 sem x100



60 sem x100

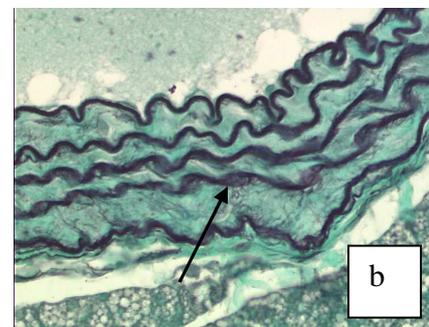


84 sem x100

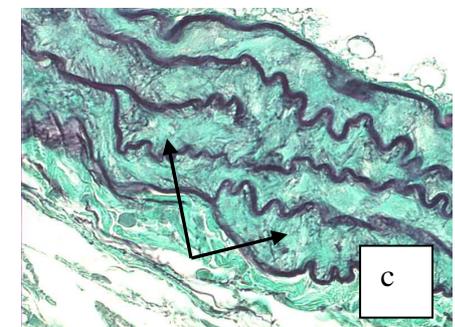
COLORATION A L'ORCEINE (figure 9)



12 sem x160

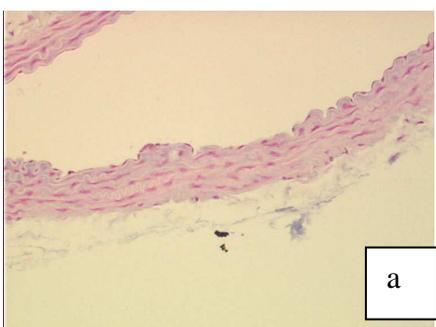


60 sem x160

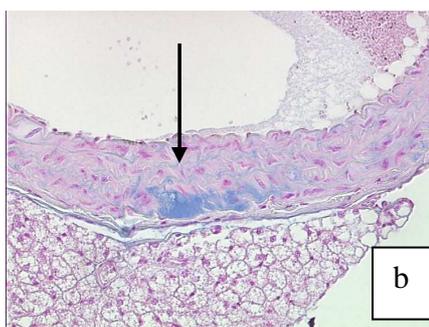


84 sem x160

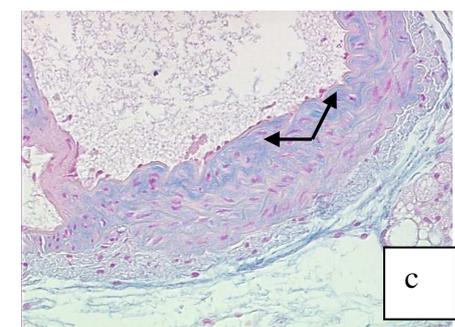
COLORATION AU BLEU ALCIAN (Figure 10)



12 sem x25

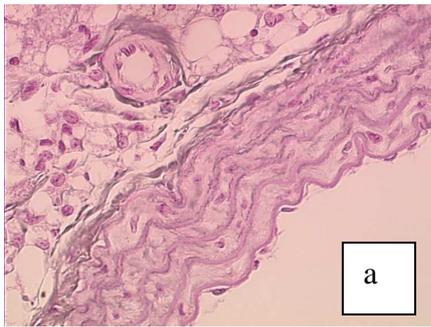


60 sem x25



84 sem x25

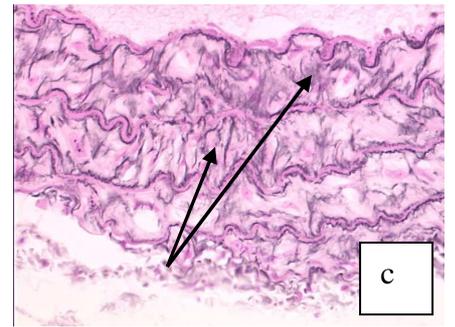
COLORATION VOLGENS-GOMORI (figure 11)



12 sem x160

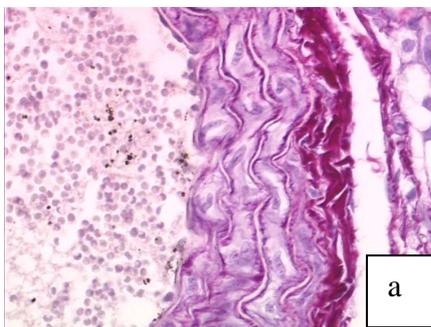


60 sem x160

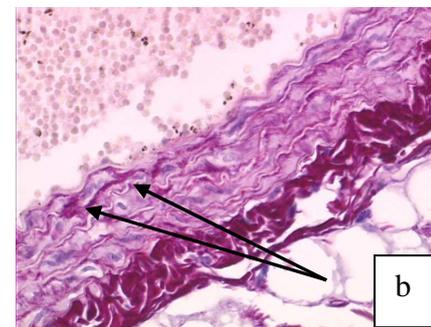


84 sem x160

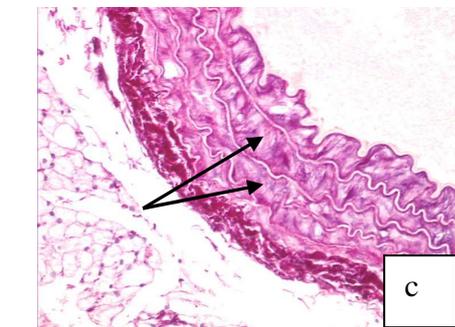
COLORATION AU ROUGE SIRIUS (figure 12)



12 sem x160

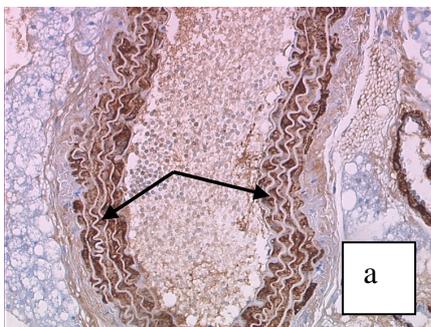


60 sem x160

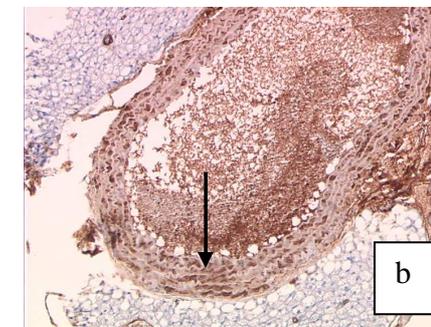


84 sem x160

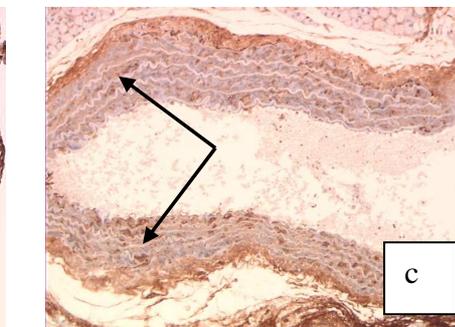
IMMUNO MARQUAGE : ACTINE LISSE (figure 13)



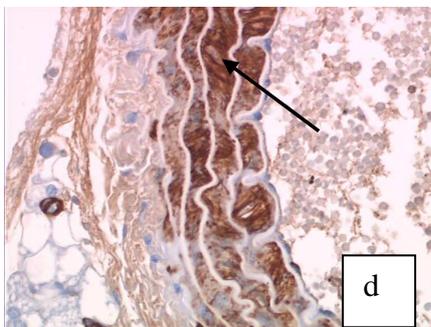
12 sem x100



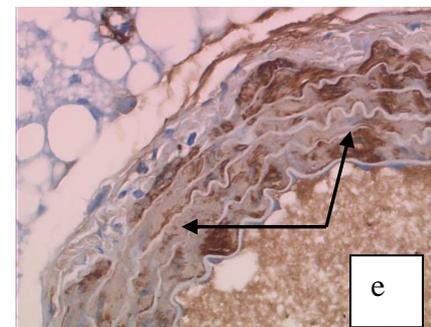
60 sem x100



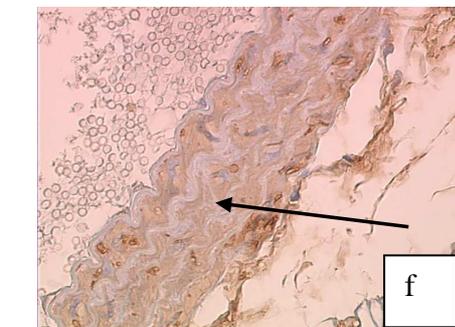
84 sem x100



12 sem x160

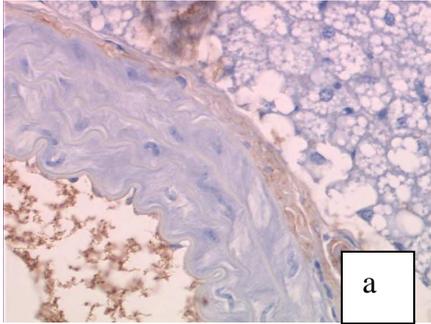


60 sem x160

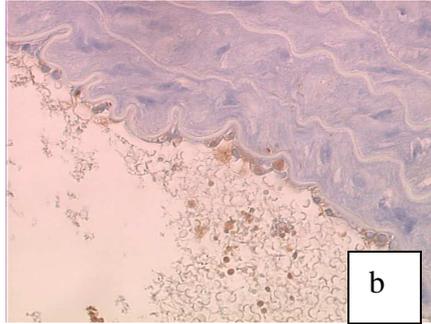


84 sem x160

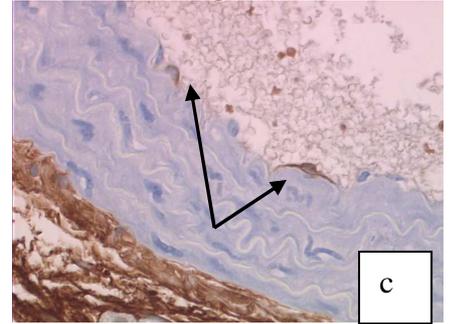
IMMUNOMARQUAGE AVEC IMMUN-SERUM ANTI- PCNA (figure 14)



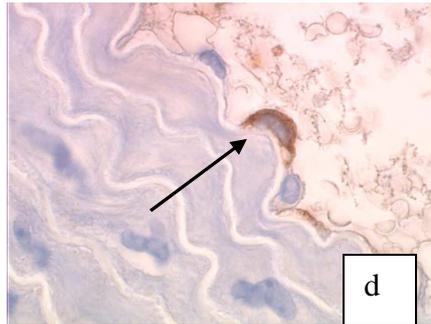
12 sem x160



60 sem x160

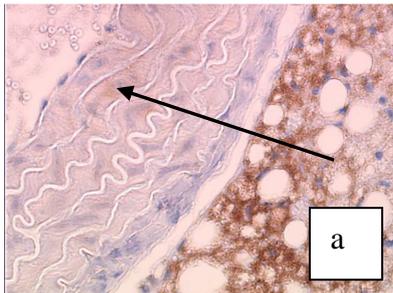


84 sem x160

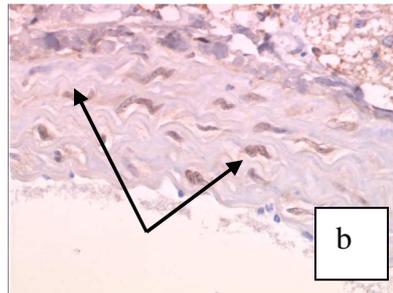


84 sem x400

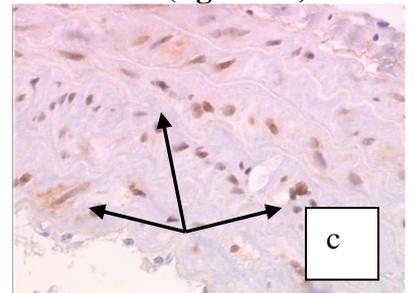
IMMUNO-MARQUAGE AVEC IMMUN SERUM ANTI-AGE (figure 15)



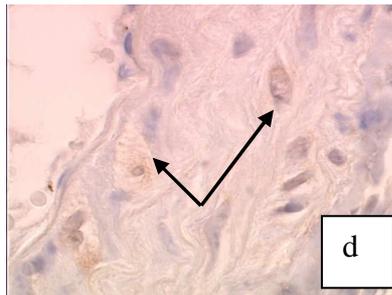
12 sem x160



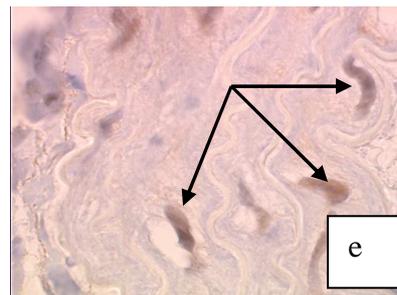
60 sem x160



84 sem x160

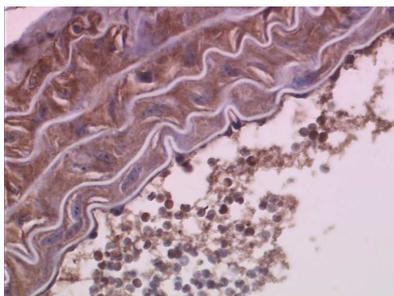


60 sem x400

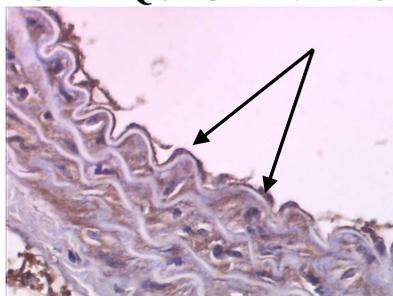


60 sem x400

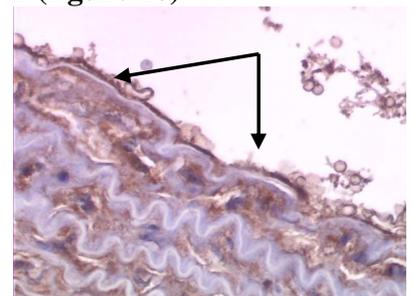
IMMUNOMARQUAGE ANTI VCAM-1 (figure 16)



12 sem x160



60 sem x160



84 sem x160

b. Immuno- marquage avec un immun sérum anti PCNA

- **Souris âgées de 12 semaines :**

On objective sur le pourtour de la lumière vasculaire, 55 à 60 cellules endothéliales identifiables à leurs noyaux. Aucune cellule n'est marquée au niveau de l'intima ni au niveau de la média sur tout le pourtour du vaisseau (Figure 14 a).

- **Souris âgées de 60 semaines :**

On note le même nombre de cellules endothéliales. Comme pour les souris de 12 semaines, aucune cellule n'est marquée, même dans les zones morphologiquement altérées (Figure 14 b).

- **Souris âgées de 84 semaines :**

On retrouve 55 à 60 cellules sur le pourtour vasculaire. On note un marquage cytoplasmique et nucléaire des cellules endothéliales (Figure 14 c,d). Très peu de cellules sont marquées dans la média, dans des zones altérées.

Souris 84 semaines	Nombre total de cellules marquées	CE M cytoplasmique	CE M nucléaire	M des CML
Souris n°1	6 cellules /60	5 marquages	1 marquage	0 marquage
Souris n°2	18 cellules /60	14 marquages	3 marquages	1 marquage
Souris n°3	18 cellules /60	14 marquages	3 marquages	1 marquage
Souris n°4	16 cellules /60	11 marquages	5 marquages	0 marquage
Souris n°5	14 cellules /55	10 marquages	4 marquages	0 marquage
Souris n°6	15 cellules /60	12 marquages	3 marquages	0 marquage

Tableau 2 : Nombre et type de cellules marquées par l'anticorps antiPCNA

CE : cellules endothéliales ; M : marquage

Conclusion : Seules les souris âgées de 84 semaines voient un marquage des cellules endothéliales.

c. Immuno- marquage avec un immun sérum anti AGEs

- **Souris âgées de 12 semaines :**

On observe un très faible marquage, péri nucléaire, dans quelques zones. On ne peut préciser si les dépôts s'effectuent au niveau de la matrice extra-cellulaire ou au niveau cytoplasmique des cellules musculaires, les limites cytoplasmiques n'étant pas repérables. Les lésions se situent sur tout le pourtour vasculaire. La positivité est très faible (Figure 15 a).

- **Souris âgées de 60 semaines :**

L'Immuno marquage, au niveau de la média, montre des flaques positives surtout péri nucléaires ; quelques noyaux de cellules musculaires lisses sont également très faiblement marqués. Les noyaux des cellules endothéliales ne sont pas marqués (Figure 15 b,d).

- **Souris âgées de 84 semaines :**

Sur le pourtour pariétal, le marquage nucléaire, quand il existe, est plus intense. Les noyaux positifs sont disséminés et assez nombreux. Tous les noyaux ne sont pas marqués. On note, en péri nucléaire des flaques positives faiblement marquées. On objective une accentuation nette des dépôts d'AGEs chez ces souris en comparaison avec les deux autres groupes (Figure 15 c,e).

Conclusion : on note une augmentation du marquage antiAGEs au cours du vieillissement.

d. Immuno marquage avec un immun sérum anti VCAM-1

- **Souris âgées de 12 semaines**

L'immuno marquage montre un très faible marquage soulignant l'endothélium sur tout le pourtour vasculaire (Figure 16 a).

- **Souris âgées de 60 semaines:**

Le marquage est discontinu, on constate qu'il est légèrement plus intense dans certaines zones comparé au groupe précédent (Figure 16 b).

- **Souris âgées de 84 semaines :**

Il semble y avoir un marquage membranaire endothélial d'intensité plus marqué et un liseré endothélial continu pour ce groupe de souris (Figure 16 c).

Conclusion :

Le marquage VCAM-1 de la surface endothéliale est accentué de façon plus intense et diffuse, au cours du vieillissement sur toute la circonférence du vaisseau.

Limites

L'interprétation de VCAM-1 a été gênée par la présence d'un bruit de fond important.

	12 semaines	60 semaines	84 semaines
Epaisseur intima-média	référence	↑	↑↑
Coloration HES		Altérations focales de la média	Désorganisation de la média
Coloration à l'Orcéine	LE parallèles, régulières	Ecartements focaux des LE	LE fragmentées, amincies, épaissies, écartées
Coloration au Rouge Sirius	CI et III homogènes	« Effilochage » de fibres de C	Prolifération de C en plaques
Coloration Volgens-Gomori	CIII souligne LM	C focalement dissocié des lames élastiques	Altérations importantes C perpendiculaires aux LM
Coloration au Bleu Alcian	MEC homogène	Plaques de MPS + dans la média	Plaques de MPS +++ dans la média
Immuno marquage anti actine lisse	+++ et homogène dans la média	++ et inhomogène dans la média	+
Immuno marquage anti PCNA	0	0	+
Immuno marquage anti VCAM-1	+	++ et peu intense	+++ et intense
Immuno marquage avec anti AGE	+	++, intra et extra cellulaire	++, surtout intranucléaire

Tableau 3. Récapitulatif des modifications histologiques survenant au cours du vieillissement artériel.

LE : Lames élastiques ; C : collagène ; CI : collagène I ; CIII : collagène III ; MEC : matrice extracellulaire ; MPS : mucopolysaccharides

7.2.2. Effet de l'aspirine à faible dose

L'étude de l'effet de l'âge sur la paroi artérielle ayant montré que les modifications anatomopathologiques sont les plus marquées sur le segment de la crosse aortique comparée à l'aorte proximale, médiane et distale, pour l'étude de l'effet de l'aspirine à faible dose, seule la crosse aortique a été étudiée.

L'étude est réalisée chez des animaux de 68 semaines ayant été traités ou non par aspirine pendant 8 semaines (traitement initié à 60 semaines).

7.2.2.a. Groupe « No Asp »

Les résultats sont reproductibles pour l'ensemble du groupe.

Sur les plans de coupe transversaux de l'aorte, l'endothélium est préservé.

En coloration standard H.E.S., sur environ 3/4 de la circonférence et même parfois sur la totalité, la média est épaissie. L'épaisseur maximale moyenne de la média est de $110\pm 9\mu\text{m}$ et l'épaisseur minimale moyenne de $60\pm 12\mu\text{m}$. Dans cette zone d'épaississement, les noyaux des cellules musculaires lisses sont plus nombreux que dans les zones saines. Leur morphologie est également modifiée : les noyaux sont plus volumineux et plus clairs que dans la zone non épaissie (Figure 3Ca article page H1567).

Sur la coloration à l'orcéine, il existe une altération des lames élastiques qui sont d'épaisseur inégale avec tendance à l'élargissement. Certaines sont plus épaisses et d'autres sont fragmentées ou anastomosées (Figure 3Cc article page H1567).

La matrice extracellulaire est clarifiée dans certaines zones.

Sur les coupes colorées au bleu alcian, il existe un dépôt diffus bleu alcianophile, le plus souvent dans les régions clarifiées de la matrice extracellulaire repérées sur la coloration à l'H.E.S.

La coloration au rouge sirius montre des altérations du réseau de collagène de type I dans les zones où la média est épaissie. Le collagène souligne moins nettement les lames élastiques dans les zones altérées que dans les zones non altérées et s'effiloche dans la substance fondamentale entre les lames élastiques. Il se dispose perpendiculairement aux lames élastiques dans la matrice extracellulaire.

Le réseau réticulinique (collagène type III) mis en évidence par la coloration de Volgens Gomori est également altéré : les fibres de réticuline se disposent perpendiculairement dans les espaces entre les lames élastiques (Figure 3Ce article page H1567).

L'immunomarquage avec un immun sérum anti actine lisse (Figure 3Cg article page H1567) objective un réseau d'actine désorganisé avec une répartition inhomogène de l'actine, dans ces mêmes zones remaniées et repérées en coloration standard.

L'immunomarquage avec anticorps anti VCAM-1 révèle un faible marquage endothélial sur tout le pourtour de la lumière vasculaire. A l'immersion, un marquage positif soulignant parfois les lames élastiques est également retrouvé dans la média.

En conclusion, on note des modifications de la paroi vasculaire sur 3/4 de la circonférence de la crosse aortique avec altérations franches du réseau élastique, de collagène et actinique et avec des remaniements de la matrice extracellulaire.

7.2.2.b. Groupe « Asp »

On ne retrouve pas de modification de l'intima.

En coloration standard, les coupes transversales montrent des modifications sur environ 2/3 de la circonférence. L'épaisseur maximale moyenne de la média est de $112 \pm 4 \mu\text{m}$ et l'épaisseur minimale moyenne de $52 \pm 7 \mu\text{m}$. A l'endroit où la média est plus épaisse, la trame élastique est altérée avec des lames élastiques d'épaisseur irrégulière, et qui se fragmentent et s'anastomosent. On observe également une clarification de la matrice extracellulaire des espaces inter lamellaires (Figure 3Cb article page H1567).

La coloration à l'orcéine montre les mêmes modifications des lames élastiques que dans le groupe « No Asp » (Figure 3Cd article page H1567).

Les dépôts alcianophiles sont moins diffus, correspondant aux zones clarifiées et semblent moins abondants que chez les souris « No Asp ».

La coloration au rouge sirius retrouve l'aspect des fibres de collagène qui se dispersent dans la matrice extracellulaire perpendiculairement aux lames élastiques.

L'imprégnation argentique révèle un réseau réticulinique fragmenté quasi inexistant parfois ; cet aspect est complètement différent de celui noté dans le groupe « No Asp ».

L'immunomarquage à l'actine lisse montre un réseau actinique pauvre dans certaines zones et inhomogène (Figure 3Ch article page H1567).

L'immunomarquage anti VCAM-1 est faible sur l'endothélium et quasi absent au niveau de la média.

En conclusion, dans le groupe traité par aspirine, au niveau de la média il existe des altérations pariétales sur 2/3 de la circonférence. Les altérations du réseau élastique et du collagène de type 1 sont superposables au groupe contrôle en dehors du réseau de réticuline.

Conclusion générale

La comparaison des moyennes des épaisseurs maximales et minimales de l'intima-média sur chaque coupe n'a pas montré de différence significative entre les 2 groupes.

Dans le groupe « Asp », on remarque une fragmentation et un appauvrissement important du réseau réticulinique.

Le marquage anti-VCAM-1 semble moins important dans le groupe « Asp » mais l'interprétation reste difficile et doit être nuancée en raison du faible marquage.

Les dépôts alcianophiles sont moins abondants dans le groupe aspirine et sont disposés de façon hétérogène.

A la lecture des lames en coloration standard, le nombre de noyaux des cellules musculaires lisses situés dans la média ainsi que leur taille semblait plus important dans le groupe témoin. Afin de confirmer cette hypothèse le nombre de ces noyaux a été compté manuellement en aveugle par deux opérateurs différents et l'existence d'une prolifération nucléaire étudiée par immunohistochimie par l'anticorps anti PCNA (Tableau 4).

Il n'y a pas de différence significative du nombre de noyaux dans la média et du pourcentage de cellules marquées au PCNA entre les deux groupes (p=NS).

	Endothélium			Média		
	CT	CM	% de CM /CT	CT	CM	% de CM /CT
Groupe « No Asp »	75,86	1,57	2,09	426,43	2,29	0,69
Groupe « Asp » p	82	1,20	1,53 NS	623,4	2,40	0,51 NS

Tableau 4. Résultats du comptage de nombre total de cellules (CT) et du nombre de cellules marquées au PCNA (CM). Résultats exprimés en moyenne.

7.3. Réactivité aortique

Cf article

7.4. Dosage des AGEs circulants

Les dosages d'AGEs plasmatiques ne font pas apparaître de différence significative entre les groupes en fonction de l'âge. On note une très grande variabilité interindividuelle au sein d'un même groupe d'âge, surtout dans le groupe d'âge élevé. (Tableau 5)

	12 semaines	60 semaines	84 semaines	p
AGEs ($\mu\text{g/ml}$)	$0,45\pm 0,12$	$0,52\pm 0,61$	$0,52\pm 1$	NS

Tableau 5. Dosage des AGEs plasmatiques exprimés en moyenne \pm sem

7.5. Expression protéique de RAGE et VCAM-1 (Figure 17)

Il n'existe pas de différence d'expression des protéines RAGE et de VCAM-1 au niveau aortique entre les 3 groupes de souris C57B/6J (12, 60 et 84 semaines).

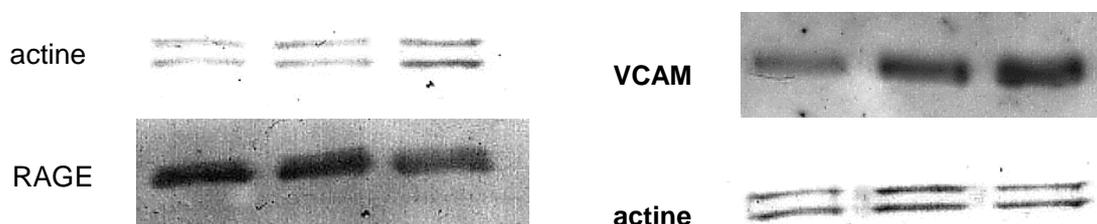
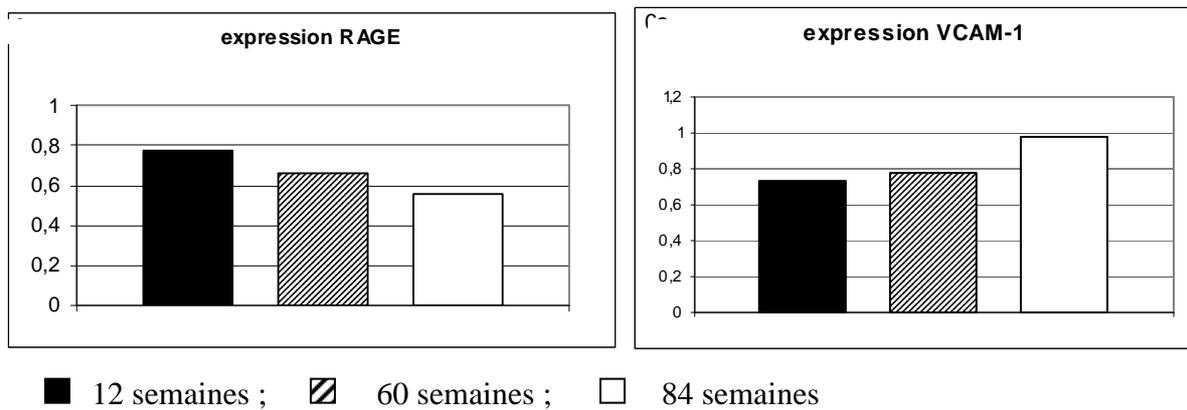


Figure 17. Analyse en Western Blot de l'expression protéique de RAGE et VCAM-1 au niveau de l'aorte thoracique de souris C57BL/6J en fonction de l'âge:. Les histogrammes correspondent au ratio de la protéine étudiée sur l'actine.

7.6. Marqueurs du stress oxydant

Il n'existe pas de différence significative entre le groupe 60 semaines et le groupe « No Asp » pour les différents marqueurs du stress oxydant étudiés.

La SOD est significativement plus élevée dans le cœur ($p=0,046$) et le MDA plus bas dans le cœur et le plasma des souris « No Asp » (respectivement $p=0,025$ et $0,006$) comparé aux souris « Asp ».

Les tableaux 6 et 7 résument les résultats dans les différents organes prélevés.

Les résultats des concentrations de 8OhdG et MDA aortiques sans et avec traitement par aspirine sont développés dans l'article.

	foie		sang		coeur		rein	
	60 semaines	« No Asp »	60 semaines	« No Asp »	60 semaines	« No Asp »	60 semaines	« No Asp »
SOD (U/mg de protéines)	0,035 ±0,037	0,024 ±0,042			0,15 ±0,089	0,045 ±0,078	0,07 ±0,075	0,09 ±0,07
NO (µM/g de protéines)	23,714 ±4,988	21,708 ±4	85,745 ±23,829	74,412 ±12,429	15,812 ±1,795	14,321 ±1,484	18,966 ±2,272	20,186 ±4,923
GSSG/GSH	8,716 2,485	2,06 ±0,832	5,275 ±0,826	1,643 ±0,8	1,768 ±0,566	0,98 ±0,503	0,279 ±0,049	0,341 ±0,233
MDA (µM/mg de protéines)	0,048 ±0,007	0,035 ±0,006	0,058 ±0,027	0,059 ±0,034	0,116 ±0,013	0,112 ±0,018	0,12 ±0,015	0,112 ±0,022
TNFα (pg/mg de protéines)	1,053 ±0,282	1,231 ±0,558	0,179 ±0,035	0,189 ±0,063	1,178 ±0,357	1,135 ±0,303	0,483 ±1,854	0,441 ±0,095

Tableau 6. Comparaison de dosages des marqueurs du stress oxydant dans les groupes 60 semaines et « No Asp » dans les différents organes prélevés. Résultats exprimés en moyenne ± sem

	foie		sang		coeur		rein	
	« No Asp »	« Asp »	« No Asp »	« Asp »	« No Asp »	« Asp »	« No Asp »	« Asp »
SOD (U/mg de protéines)	0,024 ±0,042	0,011* ±0,027			0,045 ±0,078	0,193 ±0,088	0,09 ±0,07	0,08 ±0,123
NO (µM/g de protéines)	21,708 ±4	23,57 ±4,837	74,412 ±12,429	71,198 ±7,871	14,321 ±1,484	16,766 ±3,519	20,186 ±4,923	23,248 ±4,914
GSSG/GSH	2,06 ±0,832	2,034 ±0,494	1,643 ±0,8	1,004 ±0,175	0,98 ±0,503	0,888 ±0,863	0,341 ±0,233	0,228 ±0,151
MDA (µM/mg protéines)	0,035 ±0,006	0,037 ±0,009	0,059 ±0,034	0,095* ±0,066	0,112 ±0,018	0,147* ±0,031	0,112 ±0,022	0,122 ±0,018
TNFα (pg/mg de protéines)	1,231 ±0,558	1,006 ±0,1	0,189 ±0,063	0,178 ±0,03	1,135 ±0,303	1,201 ±0,172	0,441 ±0,095	0,502 ±0,074

Tableau 7. Comparaison de dosages des marqueurs du stress oxydant dans les groupes « Asp » et « No Asp » dans les différents organes prélevés. Résultats exprimés en moyenne ± sem. * : p<0,05

8. DISCUSSION

La première partie du travail a permis de mettre en évidence que le vieillissement physiologique artériel est un processus progressif tant sur le plan fonctionnel qu'histologique et que le modèle C57B/6J est un bon modèle de vieillissement physiologique de l'endothélium artériel. Alors que les données de la littérature s'accordent pour affirmer que la dysfonction endothéliale en elle-même est un facteur de risque d'accidents vasculaires, nous avons dans la deuxième partie du travail tenter d'agir sur la dysfonction endothéliale qui apparaît au cours du vieillissement. En raison des hypothèses physiopathologiques de la dysfonction endothéliale liée au vieillissement physiologique, des propriétés de l'aspirine et de l'action de l'aspirine sur la dysfonction endothéliale dans des modèles autres que le vieillissement physiologique, des souris C57B/6J ont été traitées à des âges différents par de l'aspirine à faible dose de façon chronique. Nous avons montré que la fonction endothéliale était préservée chez des animaux d'âge moyen traités par l'aspirine et que l'efficacité de cette molécule était d'autant plus importante que le traitement était débuté tôt.

L'incidence des accidents cardiovasculaires et cérébrovasculaires augmente avec l'âge. L'augmentation de l'espérance de vie et le vieillissement de la population qui est son corollaire aura pour conséquence l'augmentation du nombre des accidents vasculaires en valeur absolue avec des conséquences économiques mais également des conséquences en terme de qualité de vie et de perte d'autonomie des patients âgés. Le vieillissement artériel est reconnu comme un facteur de risque de survenue d'accidents vasculaires. Etudier et comprendre le vieillissement artériel et ses mécanismes peut déboucher sur des opportunités thérapeutiques permettant de diminuer le risque d'accidents vasculaires.

L'objectif de ce travail est d'étudier le facteur vieillissement artériel. Peu de travaux se sont consacrés à ce paramètre « vieillissement ». La plupart des études explorent l'artère dans des conditions particulières d'exposition à des facteurs de risque vasculaire en dehors du vieillissement physiologique ou lorsque l'artère présente déjà des lésions. Or les premiers effets du vieillissement physiologique se produisent en amont de l'apparition des lésions d'athérosclérose de sorte que prévenir les altérations artérielles liées au vieillissement physiologique c'est agir précocément avant l'apparition de l'athérosclérose.

Les études s'intéressant au vieillissement artériel physiologique ont été réalisées dans différents modèles animaux mais principalement chez le rat (**Russel et Watts., 2000**). Nous avons choisi d'étudier le vieillissement artériel chez la souris C57B/6j mâle en raison de l'absence de survenue de d'athérosclérose au cours de son vieillissement. Dans ce modèle, n'interviennent pas non plus les facteurs de risque d'athérosclérose, tels la dyslipidémie, l'HTA ou les troubles de la régulation glucidique comme le confirme nos résultats. Les animaux ont bénéficié d'un régime alimentaire standard, non athérogène permettant de reconstituer au mieux les conditions normales d'alimentation. Si le poids augmente de façon significative entre 12 et 60 semaines, il n'existe pas de surcharge pondérale avec l'avancée en âge, le poids restant stable entre 60 et 84 semaines (**Tiemann K et coll., 2003**). La mesure de la pression artérielle n'a pas été réalisée dans ce travail mais les études montrent que celle-ci n'augmente pas significativement avec l'âge dans ce modèle (**Goodrick et coll.,1977**). Le choix du modèle mâle évite l'imprégnation oestrogénique ralentissant le vieillissement artériel (**Goodrick et coll.,1977**). Enfin, la souris C57B6J est fréquemment utilisée pour la création de modèles génétiquement modifiés. Ainsi la suppression ou la surexpression de gènes impliqués dans le vieillissement artériel est envisageable à partir de ce modèle murin.

L'étude du vieillissement artériel a consisté à étudier l'artère, ici l'aorte thoracique tant sur le plan fonctionnel qu'histomorphologique à des âges différents : 12, 36, 60 et 84 semaines pour la vasorelaxation aortique et 12, 60 et 84 semaines pour l'étude histomorphométrique. Ces différents âges correspondent respectivement à des animaux jeunes, adultes jeunes, d'âge moyen et enfin des animaux âgés. L'étude de groupes de souris d'âge différent permet d'apprécier différents stades évolutifs du vieillissement artériel.

L'étude fonctionnelle de l'artère a été étudiée chez la souris C57B/6J en chambre d'organe isolée. Les résultats permettent d'effectuer un parallèle avec ceux retrouvés dans d'autres espèces, notamment le rat. L'étude fonctionnelle de l'aorte thoracique descendante chez des animaux de plus en plus âgés met en évidence une altération progressive de la fonction endothéliale, avec une différence significative en terme de relaxation endothélium-dépendante dès 60 semaines comparé à des animaux de 12 semaines. La relaxation maximale en acétylcholine diminue de 27% chez les animaux âgés de 84 semaines comparée aux animaux de 12 semaines. L'étude du vieillissement artériel de l'aorte de souris dans une chambre d'organe isolée n'avait jamais été réalisée. La revue de la littérature mentionne 14 études consacrées à la dysfonction endothéliale liée à l'âge. Aucune d'entre elles ne concerne la souris, et seules deux concernent l'étude de l'aorte. Koga avait comparé 3 groupes de rats d'âge différent et montré l'aggravation progressive de l'altération de la fonction endothéliale

de l'aorte avec une diminution de 75% de la relaxation maximale à l'acétylcholine entre 4-6 semaines et 12-25 mois (**Koga et coll., 1986**). Chez l'homme, il est beaucoup plus difficile d'étudier le phénomène « vieillissement physiologique », de nombreux facteurs pouvant interférer sur le vieillissement. Néanmoins, récemment, Taddei, a également mis en évidence l'aggravation progressive de la fonction endothéliale avec l'âge, chez l'homme, au niveau brachial en comparant 4 groupes de sujets d'âge différents. Si le groupe de référence de cette étude est constitué de sujets âgés de moins de 30 ans, la tranche d'âge 31-45 présente une diminution de la relaxation maximale à l'acétylcholine de 16% et les sujets de plus de 60 ans, une diminution de 37%. Connaître cette altération progressive de la fonction endothéliale est important puisque cette dernière fait le lit des maladies vasculaires. Le moment où débiter un traitement visant à restaurer la fonction endothéliale ou à prévenir la dysfonction endothéliale est important à déterminer. Ainsi, il est démontré que l'action bénéfique de l'indométhacine et de la vitamine C n'est visible sur la relaxation endothélium-dépendante que chez des sujets âgés de plus de 60 ans alors que la dysfonction endothéliale chez l'homme survient avant l'âge de 60 ans. (**Taddei et coll., 1997, Taddei et coll., 2001**). De même, en prévention primaire, chez l'homme, il a été montré que l'aspirine à faible dose avait un effet maximal sur la survenue des IDM, des AVC et de la mortalité par accidents vasculaires chez les patients de plus de 65 ans (**Sanmuganathan et coll., 2001**).

Parallèlement a été effectuée une étude histologique à 3 âges différents. L'étude couplée, fonctionnelle et histologique, n'a à notre connaissance jamais été réalisée chez la souris. Elle a permis de montrer que le vieillissement fonctionnel du vaisseau est associé et évolue parallèlement aux modifications histologiques de l'artère. Cette étude histologique a été réalisée avec des techniques standard permettant d'étudier la morphométrie et les constituants les plus importants du vaisseau à savoir collagène, élastine et cellules musculaires lisses. Il a été décidé de ne pas étudier le groupe de souris âgés de 36 semaines, les altérations fonctionnelles à cet âge n'étant pas significatives comparées à des souris âgées de 12 semaines.

Le premier résultat est qu'aucune lésion d'athérosclérose n'a été mise en évidence par les techniques employées quel que soit le groupe de souris considéré. Ceci est en accord avec le fait que le vieillissement artériel est différent du processus d'athérosclérose. Une limite de notre étude est que les souris les plus âgées avaient quatre-vingt quatre semaines ce qui ne correspond pas à la longévité maximale de cette espèce. L'étude d'un groupe d'âge plus élevé aurait peut-être montré des lésions d'athérosclérose, même si, rappelons-le, ce modèle théoriquement ne développe pas d'athérosclérose. Les résultats obtenus sont concordants avec

ceux de la littérature s'agissant du vieillissement vasculaire. L'épaisseur intima-média était augmentée avec l'âge particulièrement marquée au niveau de la crosse de l'aorte. Les altérations histologiques les plus importantes rapportées dans la littérature sont toujours décrites au niveau de la crosse de l'aorte dans les modèles d'athérosclérose. Cela s'explique par le fait des contraintes hémodynamiques plus importantes à ce niveau (**Lakatta, 2003 part III ; Lakatta, 1999**). L'augmentation de l'épaisseur intima-média n'est cependant pas linéaire avec l'avancée en âge et ce quels que soient les segments étudiés de l'aorte. Pour la crosse de l'aorte, par exemple, l'augmentation est plus forte entre 12 et 60 semaines avec une augmentation de 32% versus 6% entre 60 et 84 semaines. Nos travaux suggèrent aussi que l'augmentation de l'épaisseur de l'intima-média n'est pas homogène sur toute la circonférence du vaisseau quel que soit l'âge de l'animal. Mais plus l'animal est âgé, plus la surface épaissie de vaisseau augmente. Les altérations histologiques retrouvées concernent principalement la média, et particulièrement les zones épaissies, ce qui explique l'impression de grossissement différent entre 12 et 84 semaines sur les figures correspondantes aux méthodes à l'orcéine et de Gomori Volgens. Le fait que la technique utilisée soit qualitative et que les plans de coupe étudiés ne sont pas forcément perpendiculaires peut certes fausser l'appréciation de l'étendue de l'augmentation de l'épaisseur du vaisseau même si ces données sont retrouvées chez tous les animaux.

Il existe des altérations avec l'âge des fibres élastiques avec des lames élastiques très irrégulières, échevelées et fragmentées. Ces phénomènes correspondent à la dégradation de l'élastine par un processus enzymatique, l'élastolyse. Ainsi, la MMP2 voit son activité augmenter dans les vaisseaux avec l'avancée en âge (**Wang et coll., 2003 ; Lakatta 1999**). Mais avec les techniques utilisées dans notre étude, il est impossible de dire si la quantité de fibres élastiques diminue au cours du vieillissement comme le suggèrent plusieurs travaux (**Lakatta, 1999**), réduisant ainsi l'élasticité du vaisseau. Le réseau collagène se modifie également tant pour le collagène de type I que de type III, qui ont été respectivement étudiés par le rouge Syrius et la coloration de Volgens Gomori. Les méthodes qualitatives utilisées dans notre étude ne nous permettent pas de dire si le contingent de collagène est augmenté comme cela a été décrit par d'autres (**Wang et coll., 2003**) mais étudie la répartition du collagène au sein de la média. A 60 semaines, les fibres collagènes soulignent moins nettement les lames élastiques pour réaliser, à 84 semaines un réseau perpendiculaire à ces lames formant ainsi un quadrillage. La coloration au bleu alcian montre également une accumulation de flaques de protéoglycanes sous les lames élastiques, ce qui pourrait modifier

les phénomènes de perméabilité vasculaire, dans lesquelles les protéoglycanes sont impliqués (**Orlandi et coll., 2000**).

Les cellules musculaires lisses vasculaires ont été étudiées en immunohistochimie, par un anticorps très fréquemment utilisé pour les détecter, à savoir, l'anticorps anti-actine, l'actine étant synthétisée par les cellules musculaires lisses. La répartition et la synthèse d'actine se modifient avec l'âge comme le montrent nos résultats avec un marquage moins intense et plus hétérogène de l'actine qui se localise davantage dans les zones remaniées aux âges avancés. Quant à la diminution de l'intensité du marquage en actine, elle n'est pas rapportée comme telle dans la littérature. Néanmoins, les cellules musculaires lisses perdent leurs capacités contractiles avec l'âge et acquièrent un phénotype de synthèse, de prolifération et de migration. Face à une modification de l'environnement, telle que l'athérosclérose ou après une lésion vasculaire, elles subissent un phénomène de transformation phénotypique correspondant à un phénomène de dédifférenciation avec l'acquisition d'un phénotype proche de celui qu'ont les cellules musculaires lisses au cours des premières semaines de vie fœtale (**Schwartz et coll., 1990; Owens et coll., 1995**). Les cellules musculaires lisses évoluent ainsi vers un statut fonctionnel différent avec la perte ou la modification des protéines contractiles et une modification de la synthèse matricielle de la répartition des intégrines. L'ensemble de ces modifications les rendent aptes à répondre aux stimuli chimio-attractants et prolifératifs environnants (cytokines, facteurs de croissance, facteurs oxydatifs, LDL) (**Ross, 1999**). Ces phénomènes peuvent expliquer la modification de la répartition, déjà décrite, des cellules musculaires lisses au cours du vieillissement, le long de la lame élastique interne et des autres lames élastiques. Le marquage par l'anticorps anti-actine ne permet pas d'étudier la morphologie de ces cellules, alors qu'elles sont décrites hypertrophiques au cours du vieillissement vasculaire.

Au niveau de l'intima, notre travail n'a pas montré de modification majeure. Nous n'avons pas retrouvé d'augmentation de l'épaisseur de l'intima comme fréquemment mentionnée et particulièrement dans les travaux de Lakatta (**lakatta, 2003 part III**). Cette augmentation d'épaisseur s'expliquerait principalement par une migration et une hypertrophie des cellules musculaires lisses au sein de l'intima que les techniques que nous avons utilisées ne permettraient pas de mettre en évidence. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées quant au peu de modifications survenant avec l'âge au sein de l'intima. Le modèle animal étudié dans notre travail est différent, comme nous l'avons dit précédemment, de la plupart des modèles s'intéressant au vieillissement artériel, le rat étant plus souvent étudié. Une autre hypothèse est la puissance insuffisante de la méthode par microscopie optique alors que les altérations

intimales sont peu importantes et que les tissus étudiés sont de taille faible. L'étude en microscopie électronique permettrait d'analyser de façon plus précise l'intima. Néanmoins, nous avons pu observer dans l'intima des modifications en immunohistochimie avec, sur les coupes observées, une augmentation du nombre de cellules marquées par le PCNA avec l'âge, témoignant d'une capacité de prolifération de ces cellules. Il faut néanmoins être prudent, puisqu'il a été dit que l'expression du PCNA pouvait être surestimée (**Birner et coll.,1996**). L'étude de l'expression de l'antigène Ki67 permettrait de mieux quantifier ce phénomène de prolifération cellulaire.

L'étude des AGEs par immunohistochimie au sein de la paroi artérielle a mis en évidence une accumulation de ces AGEs. Chez l'animal âgé, l'immuno-marquage des AGEs est diffus et hétérogène, plus intense dans les zones désorganisées de la média et semble prédominer en intracellulaire. Cependant, en l'absence de double marquage des AGEs et de la membrane cellulaire, il est difficile d'affirmer la localisation intra- ou extra-cellulaire du marquage. L'aspect diffus du marquage dans notre travail peut s'expliquer aussi par le fait que l'anticorps anti-AGEs utilisé a un spectre large (**Boulanger et coll., 2002a; Ling et coll., 1998 ; Münch et coll., 2003; Wautier 2004**). Il serait sans doute intéressant de reproduire les expériences avec un autre anticorps de spectre ciblé et étroit, tel un anticorps anti-carboxyméthyllysine (CML). Une localisation intracellulaire d'AGEs a été décrite par certains auteurs dans le vieillissement (**Schleicher et coll., 1997**). Il s'agit notamment d'une localisation intracytoplasmique au sein des macrophages correspondant soit à un mécanisme de dégradation des AGEs, soit à une peroxydation lipidique. Cette localisation a surtout été décrite dans des modèles d'athérosclérose. Cependant les AGEs sont plus souvent localisés dans l'espace extracellulaire où ils participent à des liaisons entre les protéines de la matrice extracellulaires, la fibronectine, le collagène venant ainsi rigidifier cette matrice et créer un maillage au sein duquel d'ailleurs se trouve « quenché » le NO (**Chen et coll., 2002; Schmidt et coll.,1994; Schmidt et coll., 1999**). Parallèlement à l'étude immunohistochimique des AGEs, un dosage sérique des AGEs a été réalisé. On note une stabilité des concentrations plasmatiques d'AGEs circulants en fonction de l'âge des souris. Ce résultat est sujet à caution et demande à être contrôlé : Il existe en effet une grande dispersion intra-groupe des concentrations d'AGEs qui est surprenante. Une des hypothèses réside dans les conditions de recueil des prélèvements sanguins. Nous avons probablement sous-estimé l'influence de la proximité d'une prise alimentaire des souris au moment de leur sacrifice. Toutefois, si le diabète, l'insuffisance rénale terminale, l'athérosclérose, la polyarthrite rhumatoïde et la

cirrhose sont associés à une élévation des taux circulants d'AGEs, la littérature manque de données concernant l'évolution des concentrations plasmatiques au cours du vieillissement (**Jakus et coll., 2004; Makita et coll., 1991; Sharp et coll., 2003**). Hamelin et coll rapportent une élévation de la N-Carboxyméthyllysine dans le sérum de rats âgés (**Hamelin et coll., 2003**). Chez l'homme, Sharp a montré une corrélation de la concentration sérique d'AGEs de bas poids moléculaire avec l'âge et la créatininémie, aussi bien chez les diabétiques que dans la population témoin non diabétique (**Sharp et coll., 2003**). Mais d'autres études ne retrouvent pas cette association (**Jakus et coll., 2004; Kilhovd et coll., 1999**). Les AGEs, outre leur action directe sur les molécules de la matrice extracellulaire, reconnaissent de nombreux récepteurs dont les RAGE. L'expression de RAGE pourrait augmenter avec l'âge comme le suggère le travail de Park et coll. qui ont observé que l'expression de RAGE était corrélée à l'hémoglobine glyquée, un produit de glycation précoce, dans les plaques athérosclérotiques chez les diabétiques (**Park et coll., 1998**). Dans notre travail, cependant, l'étude en western blot de l'expression protéique de RAGE dans l'aorte n'a pas permis mettre en évidence d'augmentation avec l'âge. L'interaction AGE/RAGE stimule entre autres choses la synthèse des molécules d'adhésion (**Boulanger et coll., 2002b, Schmidt et coll., 1995**). Nous avons observé une tendance à la surexpression de VCAM-1 au niveau aortique des souris les plus âgées en western blot. Ces résultats sont concordants avec ceux de Mérat et coll (**Merat et coll., 2000**) qui rapportent une augmentation de l'expression de VCAM-1 au niveau de la crosse aortique avec l'âge, chez des souris LDLR^{-/-} et C57BL/6J. En immunohistochimie, VCAM-1, a été retrouvé sur toute la surface endothéliale de façon plus intense et diffuse chez les souris âgées et ce sur toute la circonférence du vaisseau, même si l'interprétation est gênée par la présence d'un bruit de fond important.

Ce travail met en évidence parallèlement, les altérations histomorphologiques et fonctionnelles du vieillissement artériel physiologique. Il est de plus en plus rapporté que ces altérations artérielles liées au vieillissement physiologique sont liées au stress oxydant (**Donato et coll., 2007 ; Hamilton et coll., 2001; Matz et coll., 2000a; Rodriguez-Martinez et coll., 1998 ; van der Loo et coll., 2000**). Les hypothèses physiopathologiques n'ont été abordées dans cette partie que de façon succincte par l'étude immunohistochimique des AGEs. Les AGEs ont un pouvoir prooxydant et, à l'inverse, le stress oxydant augmente la synthèse des AGEs (**Bailey et coll., 1998 ; Li et coll., 2005**).

Le stress oxydant est au coeur du vieillissement vasculaire. Avec l'avancée en âge, les taux sériques et aortiques de ROS/RNS (Reactive Oxygen Species / Reactive Nitric Species)

s'élèvent, traduisant une élévation du statut oxydatif et une diminution des capacités anti-oxydantes (**Spinetti et coll., 2004**). Le stress oxydant est une cause de l'altération de la relaxation endothélium-dépendant retrouvée au cours du vieillissement tant chez l'homme que l'animal (**Taddei et coll., 2001, Pacher P et coll., 2002**).

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet de l'aspirine à faible dose sur ce vieillissement artériel.

Le choix de l'aspirine a été motivé (1) par le fait que cette molécule est largement utilisée en prévention primaire et secondaire des accidents vasculaires, en particulier chez la personne âgée (2) qu'elle possède une action anti-AGE et antioxydante.

Les posologies utilisées correspondent à celles utilisées en pratique quotidienne chez l'homme (81 à 300 mg/l) soit chez la souris 3 à 4 mg/kg/j (**Campbell et coll., 2007**). La durée du traitement a été calquée sur les études de Cyrius, à savoir pendant 2 mois dans des modèles murins d'athérosclérose (**Cyrus et coll., 2002. Cyrus et coll., 2006**). Après 48 heures de dilution dans l'eau de boisson, la stabilité des concentrations de l'activité salicylate a été vérifiée. Les écarts types peu importants retrouvés lors du dosage du CYP2E1 prouvent l'absorption homogène au sein du groupe de souris traité par aspirine et donc une hydratation également homogène. Le choix du début de traitement par aspirine a été fonction des résultats de l'étape précédente à savoir l'altération significative de la relaxation endothélium-dépendante à 60 semaines comparée à 12 semaines.

L'étude de la pression artérielle et de l'hémostase n'a pas été réalisée. L'évolution de la pression artérielle au cours d'un traitement par aspirine a déjà été étudiée. Avec de fortes doses d'aspirine (100mg/kg/j) pendant au moins 53 jours et à partir de l'âge de 6 semaines, la pression artérielle de rats non hypertendus ne se modifie pas alors que celle de rats hypertendus s'abaisse de façon significative (**Wu et coll., 2002**).

L'étude de l'hémostase primaire n'a pas été réalisée. Mais Cyrus et al. ont montré que de faibles doses d'aspirine inhibaient l'agrégation plaquettaire de souris LDLR^{-/-}-comparés aux contrôles et diminuaient de façon significative l'excrétion de 2,3 dinor TxB₂, métabolite de la COX1 (**Cyrus et coll., 2006**). Aux doses d'aspirine utilisées dans l'étude, l'inhibition des COX est incomplète (**Awtry, 2000**) et la prévention de la dysfonction endothéliale par de faibles doses d'aspirine ne peut être totalement rapportée à l'inhibition des COX. D'ailleurs l'implication des COX dans l'effet antioxydant de l'aspirine est discutée puisque le traitement de rat par ibuprofène anti-inflammatoire anti-COX non sélectif, ne permet pas de diminuer la production d' O₂^{-•}.

L'action anti-oxydante de l'aspirine sur la fonction endothéliale paraît primordiale. A fortes doses chez des rats, hypertendus ou non, et de façon parallèle à l'amélioration de la fonction endothéliale, est retrouvée une diminution de la production d' O_2^{\bullet} dans l'aorte respectivement de 27 et 45% ainsi qu'une réduction de l'activité de la NADPH oxydase (**Wu et coll., 2002**). Dans notre travail, nous observons une complète prévention de la dysfonction endothéliale après un traitement de huit semaines par faibles doses d'aspirine associé à une diminution significative du stress oxydant au sein de l'aorte. Deux marqueurs de stress oxydant, le MDA et le 8OHdG, ont été étudiés au sein de l'aorte. (**Deng et coll., 2004; Goto et coll., 2000; Taubert et coll., 2004**). L'altération de la membrane phospholipidique par l'intermédiaire de la peroxydation lipidique est considérée comme un élément clé des lésions oxydatives (**De Zwart et coll., 1999**). L'étude du MDA a été réalisée dans de nombreuses circonstances pathologiques pour montrer l'étendue des dommages tissulaires causée par la peroxydation lipidique. Parmi les bases oxydées, le 8-OHdG est considéré comme un marqueur de lésions oxydatives du DNA, produit de l'attaque spécifique du radical hydroxyl sur le DNA (**Garçon et coll., 2001b; Marnett, 2000; Moller et Wallyn, 1998; Richter, 1995**). Nous avons retrouvé une diminution significative des concentrations de 8-OHdG dans l'aorte dans le groupe « Asp » comparé au groupe « No Asp ». Les concentrations de 8-OHdG augmentent rapidement après l'induction du stress oxydant, particulièrement après déplétion en glutathione (GSH). L'aspirine diminue significativement la peroxydation lipidique et restaure le contingent GSH réduit (**Tauseef et coll., 2007**). Une augmentation rapide de 8-OHdG secondaire à l'induction du stress oxydant et une action spécifique de l'aspirine sur le GSH pourrait expliquer la diminution des concentrations de 8-OHdG sans diminution significative des concentrations aortiques de MDA.

La contraction de l'aorte thoracique après traitement par aspirine n'est pas différente de celle sans traitement par aspirine. Pourtant le mécanisme d'action de l'aspirine, inhibition prédominante de la COX1, diminuant ainsi la synthèse de thromboxane A2 pourrait faire penser que la contraction des animaux traités par aspirine pourrait être modifiée. Chez des rats SHR, la tension de base de segments aortiques privés ou non de leur endothélium est plus élevée en présence d'aspirine. La réactivité de segments aortiques chez des rats Wistar-Kyoto n'est quant à elle pas altérée en présence d'aspirine suggérant que d'autres mécanismes que le métabolisme de l'acide arachidonique module la contractilité aortique (**Rahmani et coll., 1993**).

L'étude de la fonction endothéliale de l'aorte de souris C57B/6J a été couplée comme dans l'étude de l'effet de l'âge sur la fonction endothéliale à l'étude histologique et immunohistochimique.

L'étude histologique ne montre pas de modification de l'intima par l'aspirine. Ceci était attendu puisqu'aucune modification de l'intima n'avait été observée en microscopie optique à 60 semaines comparée aux souris de 12 semaines. En ce qui concerne la média, les zones d'épaississement sont moins étendues. L'épaisseur maximale moyenne n'est cependant pas modifiée. Le réseau réticulinique quant à lui est quasiment inexistant témoignant de l'action de l'aspirine. Une diminution du collagène aortique après de fortes doses d'aspirine a été précédemment décrit dans un modèle murin d'athérosclérose (**Kalkman et coll., 1995**). La diminution du contingent de collagène peut contribuer à augmenter la disponibilité du NO formé dans le vaisseau en limitant le piègeage du NO au sein du maillage de collagène, auquel contribuent les AGEs (**Bucala et coll. 1991, Baynese et coll., 2001**). Le NO piégé, favorisé par des réactions enzymatiques peut former des radicaux libres qui conduisent à des lésions de la paroi vasculaire. Les enzymes impliquées sont la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxidase, les lipooxygénases, les peroxydases et les COX (**Williams et coll., 2005**). L'immunofixation anti-VCAM1 est moins intense chez les souris « Asp » notamment au sein de l'intima. Ceci témoigne d'une modification de l'activité de synthèse des cellules endothéliales. On peut expliquer ce résultat. VCAM est en effet synthétisé par les cellules endothéliales secondairement à l'activation de NF λ B. Or l'aspirine à faible dose entraîne une diminution de l'activation de NF λ B avec pour conséquence une diminution de la synthèse de VCAM (**Jung et coll., 2006**).

La relaxation endothéliale dépendante est significativement améliorée après 8 semaines de traitement par aspirine à faible dose, avec une prévention complète de la dysfonction endothéliale. L'amélioration de la fonction endothéliale a déjà été retrouvée avec l'aspirine principalement avec de fortes doses et dans des modèles avec facteurs de risque cardiovasculaire. Deux études ont montré l'amélioration de la fonction endothéliale avec de faibles doses d'aspirine dans deux modèles d'athérosclérose. Une étude met en évidence une amélioration de la fonction endothéliale avec de faibles doses d'aspirine chez des patients, la deuxième chez des rats hypertendus après injection de LDL (**Magen et coll., 2005, Deng et coll., 2004**). L'utilisation de faibles doses d'aspirine dans un modèle murin de vieillissement physiologique est nouveau.

Nous montrons les effets bénéfiques de l'aspirine à faible dose sur la dysfonction endothéliale liée à l'âge. La dysfonction endothéliale liée à l'âge est prévenue après 2 mois de traitement par aspirine alors que la fonction non-endothélium-dépendante n'est pas modifiée.

Nous avons également testée l'hypothèse selon laquelle, plus le traitement par faible dose d'aspirine est long et meilleure est la relaxation endothélium-dépendante. Après 16 semaines de traitement, l'effet positif observé après 8 semaines de traitement est maintenu. Nous avons alors cherché à savoir si un traitement par faibles doses d'aspirine débuté chez des animaux plus âgés améliorerait la fonction endothéliale. Chez des animaux âgés de 96 semaines, de faibles doses d'aspirine administrées pendant 16 semaines n'améliorent pas la fonction endothéliale. Il semble donc que le traitement doit être initié suffisamment tôt dans la vie de la souris pour permettre d'améliorer la fonction endothéliale. D'autres mécanismes de la dysfonction endothéliale liée à l'âge, inaccessibles à l'action de l'aspirine, tels les dépôts d'AGEs dans la paroi vasculaire, pourraient s'ajouter au stress oxydant et expliquer l'absence de restauration de la fonction endothéliale. Par ailleurs, le stress oxydant augmentant avec l'âge, il se peut que l'importance du stress oxydant chez les souris de 96 semaines soit telle que l'aspirine à faible dose ne puisse réduire suffisamment ce stress pour que cela se traduise favorablement sur la fonction endothéliale.

En conclusion, notre travail montre que le vieillissement artériel lié à l'âge est un processus progressif tant fonctionnel que structural. De faibles doses quotidiennes d'aspirine données pendant 8 semaines préviennent la dysfonction endothéliale chez des souris d'âge moyen. Cet effet est en partie secondaire à la diminution du stress oxydant. Ainsi la dysfonction endothéliale liée à l'âge pourrait être prévenue. En prévention primaire des maladies vasculaires, l'efficacité de l'aspirine à faible dose chez l'adulte pourrait être liée à la préservation de la fonction endothéliale par l'intermédiaire de la diminution du stress oxydant.

DEUXIEME PARTIE
LE VIEILLISSEMENT ARTERIEL
LIE AU DIABETE.

1. DYSFONCTION ENDOTHELIALE DANS LE DIABETE

Les complications macro et microvasculaires constituent les principales causes de morbidité et de mortalité chez les patients ayant un diabète de type 1 (DT1) ou de type 2 (DT2). La perte du rôle régulateur exercé par l'endothélium sous-entendu par le terme de dysfonction endothéliale pourrait représenter une étape précoce et déterminante dans l'apparition de ces complications vasculaires.

La dysfonction endothéliale dans le diabète comme dans d'autres situations regroupe un ensemble étendu d'altérations fonctionnelles (tableau 8) dont les anomalies de vasorelaxation.

1.1. Anomalies de la relaxation endothélium-dépendante

1.1.2. Chez l'homme

La dysfonction endothéliale a été initialement décrite chez le patient diabétique au niveau du corps caverneux pénien (**Saenz de Tejada I et coll., 1989**). D'autres travaux ont bien montré par la suite les anomalies de vasorelaxation endothélium-dépendante chez des patients DT1 sans complication macrovasculaire sur les artères brachiales ou coronaires (**Khan F et coll., 1996**, **Nitenberg A et coll. 1993**). Quelques études cependant n'ont pas retrouvé ces altérations, ceci pourrait être lié à l'hétérogénéité des populations étudiées. En effet, l'absence de dysfonction endothéliale est le plus souvent observée chez des patients normoalbuminuriques avec un bon contrôle métabolique (**Smits P et coll., 1993** ; **Lambert J et coll., 1996** ; **Enderle MD et coll, 1998**), lorsqu'il existe une microalbuminurie, la dysfonction est majoritairement constatée (**Clarkson P et coll., 1996** ; **Lekakis J et coll.,1997** ; **Arcaro G et coll., 1999**). La dysfonction endothéliale s'accroît d'ailleurs en fonction de la progression de la néphropathie (**Shestakova MV et coll., 2005**). De plus, il existe une corrélation entre la sévérité de la dysfonction endothéliale et le niveau d'hyperglycémie mesurée par l'HbA1c : 1% d'HbA1c est associé à une baisse de 7% de la vasodilatation brachiale en réponse à l'acétylcholine (**Chan NN et coll., 2003**).

Les résultats obtenus dans la population diabétique de type 2 sont d'interprétation parfois difficile dans la mesure où il existe chez le même patient souvent d'autres facteurs de risque cardiovasculaire qui affectent également la fonction endothéliale.

Plusieurs auteurs ont démontré une diminution de la vasorelaxation endothélium-dépendante chez des patients diabétiques de type 2. Les anomalies de vasorelaxation endothélium-dépendante sur les artères coronaires (**Cosson E et coll., 2006**) ou périphériques (**Papaioannou G et coll., 2004**) sont d'ailleurs associées à la microalbuminurie, puissant marqueur de risque cardiovasculaire. La dysfonction endothéliale coronarienne est également associée à une augmentation des événements cardiovasculaires dans la population diabétique (**Nitenberg A et coll., 2004**).

1.1.2. Dans les modèles expérimentaux

La diminution de la vasorelaxation endothélium-dépendante sur les artères élastiques et sur les artères musculaires est largement décrite dans des modèles expérimentaux de diabète chimiquement induits par la streptozotocine ou l'allotane chez l'animal (rats, souris, lapins, hamsters, chiens,). Des résultats comparables sont observés sur l'aorte et les artères mésentériques de rats BB/E, modèles génétiques de diabète insulino-dépendant (**Lindsay R et coll., 1997**). La majorité des études qui ont observé une diminution de la relaxation endothélium-dépendante a montré une relaxation normale avec les dérivés nitrés, donneurs de NO. L'activation de la guanylate cyclase de la cellule musculaire lisse ne semble donc pas altérée (**De Vriese AS et coll., 2000**).

Dans les modèles animaux génétiques de diabète de type 2, les résultats sont plus nuancés. La vasodilatation endothélium-dépendante au niveau de l'aorte est préservée chez le rat Zucker (**Bohlen H et coll., 1995**), altérée chez le rat OLETF (**Sakamoto S et coll., 1998**). Le diabète induit par un régime hyperlipidique chez la souris C57black est associé à une diminution de la vasorelaxation aortique endothélium-dépendante (**Molnar J et coll., 2005**).

1.1.3. Mécanismes impliqués dans l'altération de la vasodilatation endothélium-dépendante dans le diabète.

La diminution de la vasorelaxation endothélium-dépendante résulte sans doute de plusieurs mécanismes : diminution de production des NO, augmentation de l'inactivation des NO, altération de la diffusion des NO vers la cellule musculaire lisse, diminution de la sensibilité de la cellule musculaire lisse aux NO, augmentation des facteurs contractants.

Pour chacun de ces mécanismes, il existe des études contradictoires dans la littérature. Aussi le modèle de diabète choisi, la durée et la sévérité du diabète sont à prendre en considération,

de même que le type de circulation, la taille des vaisseaux et les conditions de l'analyse de la vasomotricité (**Pieper GM et coll., 1999**).

1.1.3.a. Voies de transduction du signal

Les récepteurs endothéliaux des substances vasoactives (récepteurs muscariniques, récepteurs à la bradykinine...) sont couplés à différentes protéines G dont certaines peuvent être altérées par le diabète. Aussi une diminution de la relaxation induite par l'acétylcholine avec une relaxation normale à la bradykinine a été observée sur des artères résistives chez des patients DT1 (**Mac Nally P et coll., 1994**), et dans le DT2 au niveau de la vasodilatation brachiale (**Gazis A et coll., 1999**).

1.1.3.b. Biodisponibilité du substrat

La réduction de la biodisponibilité de l'arginine (anomalie métabolique ou de transport) pourrait favoriser la dysfonction endothéliale. En effet, une diminution des concentrations sériques d'arginine a été observée chez les rats diabétiques. Ceci pourrait être lié à une augmentation de consommation pour synthétiser le NO. Un apport exogène d'arginine restaure partiellement la vasorelaxation endothélium-dépendante dans certaines études (**Angulo J et coll., 1998 ; Pieper GM et coll., 1995**) mais pas dans toutes (**Heygate K et coll., 1995, Koltai M et coll., 1997**). Ces résultats discordants pourraient être liés à un effet non spécifique de la L-arginine. En effet, il s'agit d'un acide aminé qui stimule la libération d'insuline et par ce biais pourrait favoriser une vasorelaxation (**Mac Allister R et coll., 1995**).

1.1.3.c. Biodisponibilité du NO.

Une relaxation d'une durée plus courte, transitoire, a été observée sur l'aorte de rat diabétique alors même que le niveau de relaxation était normal (**Hattori Y et coll., 1991**). La superoxyde dismutase restaure la vasorelaxation, suggérant une inactivation de NO par les espèces réactives de l'oxygène.

1.1.3.d. Diminution de sensibilité de la cellule musculaire lisse au NO

La majorité des études chez l'animal observe une diminution de la relaxation endothélium-dépendante avec préservation de la vasorelaxation endothélium-indépendante induite par les donneurs de NO. Ceci suggère donc que le diabète n'altère pas la sensibilité de la cellule musculaire vis à vis du NO. Cependant, chez l'homme, une altération de la vasodilatation

endothélium-indépendante a été plusieurs fois observée notamment dans une étude récente sur une large cohorte de patients DT1 (**Chan NN et coll., 2003**).

Ces résultats discordants pourraient être liés à un état plus avancé de la maladie diabétique chez l'homme (**De Vriese AS et coll., 2000**). En accord avec cette hypothèse, il n'est pas observé d'anomalie de la vasorelaxation endothélium indépendante chez des patients normoalbuminuriques (**Lekakis J et coll., 1997**).

1.1.3.e. Altération de l'EDHF

Le rôle de l'EDHF dans le diabète pour les petites artères de résistance n'est pas clair dans la mesure où les résultats chez l'animal sont très contradictoires (**Fitzgerald S et coll., 2005**). Ainsi chez le rat diabétique, il est observé une altération de l'EDHF sur les artères mésentériques (**Fukao M et coll., 1997**) mais non sur l'aorte (**Endo K et coll., 1995**) suggérant ainsi le rôle prépondérant de l'EDHF pour les petites artères. Chez le patient diabétique, le diabète diminue la vasorelaxation endothélium-dépendante via l'EDHF (**Angulo J et coll., 2003**). Chez la souris Db/Db en revanche, l'activité de l'EDHF sur les artères mésentériques semble augmentée suggérant qu'il pourrait s'agir d'un mécanisme compensateur face à l'altération de la voie du NO (**Pannirselvam M et coll., 2002**).

1.1.3.f. Les facteurs contractants.

Plusieurs études ont impliqué une surproduction d'agents contractants, principalement des prostanoïdes dans la physiopathologie de la dysfonction endothéliale, *in vivo* sur les artétiolles de pie-mère (**Mayhan W et coll., 1991**), et sur des aortes isolées (**Shimizu K et coll., 1993**). Ces facteurs contractants sont libérés avec les EDRFs et inhibent ainsi les effets de ceux-ci sur la cellule musculaire lisse. Les anomalies de vasorelaxation sont restaurées par l'utilisation des inhibiteurs non spécifiques de la cyclo-oxygénase et les antagonistes des récepteurs prostanoïdes TP mais non par les bloqueurs de la thromboxane A2 synthase suggérant ainsi le rôle des prostaglandines (**Mayhan W et coll., 1991 ; Shimizu K et coll., 1993**). Cependant les inhibiteurs de la cyclo-oxygénase sont sans effet sur les anomalies de vasorelaxation sur les artères mésentériques (**Fukao M et coll., 1997 ; Taylor P et coll., 1992**), sur le cœur perfusé (**Fulton D et coll., 1996**).

1.2. Les protagonistes de la dysfonction endothéliale dans le diabète

La dysfonction endothéliale dans le diabète relève des perturbations multiples dont les principaux protagonistes sont l'hyperglycémie, le stress oxydant, l'aldose réductase, la protéine kinase C, la PARP (La poly(ADP-ribose) polymerase) et les AGEs.

1.2.1. L'hyperglycémie

L'hyperglycémie est clairement reconnue comme le principal protagoniste de la physiopathologie des complications du diabète. Elle conduit d'une part à des modifications aiguës répétées du métabolisme intracellulaire (activation de la voie des polyols, activation de la protéine kinase C, surproduction d'ion superoxyde) d'autre part, à des modifications au long court sur la structure et la fonction des protéines via les AGEs.

La diminution de la relaxation endothélium-dépendante induite par l'acétylcholine est corrigée par un traitement chronique par insuline (**Rodriguez-Manas L et coll. 2003 ; Wang Y et coll., 1993**) tandis que l'administration aiguë d'insuline n'a pas d'effet, alors même que la glycémie est normalisée (**Wang Y et coll., 1993**). Les anomalies de vasorelaxation sont restaurées 4 semaines après la transplantation pancréatique chez des rats diabétiques avec 12 semaines de diabète (**Pieper GM et coll., 1998**). Il existe une corrélation étroite entre la sévérité de la dysfonction endothéliale et l'équilibre métabolique chez le rat diabétique induit par la streptozotocine dont le degré d'hyperglycémie est contrôlé par des injections d'insuline (**Rodriguez-Manas L et coll., 1998**). Parallèlement, une exposition aiguë, de quelques heures, à une forte concentration de glucose conduit à une dysfonction endothéliale similaire à celle observée chez l'animal diabétique.

Chez le patient diabétique, les résultats sont contradictoires dans la mesure où certaines études, mais pas toutes, retrouvent une corrélation entre l'HbA1c et la diminution de la relaxation endothélium-dépendante. Il faut souligner que dans l'étude de Chan qui analyse plus de 150 patients DT1, il existe une corrélation étroite entre la réponse à l'acétylcholine et le taux d'HbA1c sur la vasomotricité brachiale (**Chan NN et coll., 2003**).

1.2.2. Le stress oxydant (Szabo C, 2009)

Cf partie 1, 3.2.2.a.

- **La production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans le diabète**

Le diabète est associé à une augmentation de la production des radicaux libres oxygénés et une diminution des défenses antioxydantes, caractérisée par une diminution des concentrations de superoxyde dismutase, catalase, glutathione et acide ascorbique (**Giugliano D et coll, 1996**). Les sources de radicaux libres sont multiples dans le diabète : l'auto-oxydation du glucose (**Wolff S et coll., 1987**), l'augmentation du substrat dans la voie des polyols, la synthèse des AGEs et la liaison à leur récepteur (Cf infra), la chaîne respiratoire mitochondriale, la stimulation du métabolisme des eicosanoïdes. Egalement, il a été observé dans le diabète une augmentation de l'activité de la NAD(P)H oxydase (**Hink U et coll., 2001**) qui est une source majeure d'ions superoxydes. L'implication d'autres enzymes telles que la xanthine oxydase est possible.

- **Interactions entre les espèces réactives de l'oxygène et la biodisponibilité du NO**

Plusieurs mécanismes rendent compte du rôle délétère des ROS sur la biodisponibilité du NO. Premièrement, les ions superoxydes réagissent rapidement avec le NO pour former les peroxynitrites. Deuxièmement, il a été récemment rapporté que les ions superoxydes pouvaient générer la dégradation oxydative du cofacteur tétrahydrobioptérine d'eNOS. Ceci conduit à la NOS dite «découplée» c'est-à-dire une enzyme qui produit des ions superoxydes et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ceci est observé chez le rat diabétique (**Hink U et coll., 2001**). Troisièmement, l'activité d'eNOS est diminuée par l'augmentation de son inhibiteur (endogenous No-synthase inhibitor asymmetric, ADMA) en lien avec le stress oxydant. Ainsi, le déséquilibre redox de la cellule endothéliale a un effet délétère fort sur la biodisponibilité du NO (figure 4).

- **Efficacité des anti-oxydants sur la dysfonction endothéliale dans le diabète**

L'administration de molécules piégeant l'anion superoxyde telles que la superoxyde dismutase (**Hattori Y et coll., 1991, Tesfamarian&Cohen, 1992, Pieper GM et coll, 1996**) ou l'association avec une catalase (**Pieper GM et coll., 1997**) améliorent ou normalisent la vasorelaxation endothélium-dépendante dans différents modèles de diabète. De même, l'administration d'antioxydants non enzymatiques tels que le probucol (**Tesfamarian&Cohen 1992**), le N-acétylcystéine (**Pieper GM et coll, 1998b**), la vitamine E (**Keegan A et coll, 1995**) et la vitamine C préviennent le développement de la dysfonction endothéliale en clinique et dans des modèles expérimentaux. Mais, la supplémentation de patients DT2 en vitamine E pendant 8 semaines n'améliore pas la vasomotricité sur l'artère brachiale (**Gazis A et coll., 1999**).

1.2.3. L'aldose réductase

L'hyperglycémie active la voie des polyols. Les inhibiteurs de l'aldose réductase limitent les complications du diabète telles que l'albuminurie, la neuropathie et la cataracte dans les modèles animaux (**Narayanan S, 1993**). Ils améliorent dans la plupart des essais chez l'animal la vasorelaxation endothélium-dépendante (**Cameron N et coll., 1992, Tesfamariam B et coll., 1993 ; Taylor P et coll., 1994**). Les mécanismes responsables de l'effet bénéfique des inhibiteurs de l'aldose réductase ne sont pas clairement établis, mais plusieurs hypothèses sont émises. D'une part, l'aldose réductase consomme le NADPH pour convertir le glucose en sorbitol. Le NADPH est nécessaire pour l'activité de eNOS, également pour la glutathione réductase. D'autre part, la voie des polyols est forte « consommatrice » d'ATP, ce qui peut inhiber la production de NO. Les inhibiteurs de l'aldose réductase permettraient ainsi de préserver le stock de NADPH et d'ATP. Pourtant ces molécules efficaces sur la neuropathie diabétique chez l'animal, se sont montrées décevantes en clinique chez le patient diabétique avec neuropathie (**Oates PJ, 2008**).

1.2.4. La protéine kinase C

L'hyperglycémie conduit à l'activation de la protéine kinase C (PKC), préférentiellement l'isoforme β . Le spectre d'action de la PKC est étendu. Concernant le tonus vasculaire, d'une part, elle active la phospholipase A2 et par conséquent favorise la synthèse des dérivés de l'acide arachidonique, d'autre part, elle inhibe la pompe Na/K ATPase. Chez l'animal, les inhibiteurs de la PKC restaurent la vasorelaxation endothéliale sur les artérioles de la pie-mère (**Pelligrino D et coll., 1994**), sur l'aorte de rat streptozotocine en augmentant la biodisponibilité du NO (**Hink U et coll., 2001**) mais non sur l'artère mésentérique (**Diedrich D et coll., 1994**). La libération des facteurs prostanoides liée à l'exposition au glucose est inhibée par les inhibiteurs de la PKC (**Tesfamariam B et coll., 1991**).

1.2.5. La poly(ADP-ribose) polymérase (PARP)

La PARP est une enzyme nucléaire qui répare les cassures de l'ADN liées aux radicaux libres (peroxynitrite et radicaux hydroxylés). En réponse à une forte concentration en glucose du milieu *in vitro* ou de l'hyperglycémie *in vivo*, il existe une génération d'espèces oxygénées et de réactifs nitrogénés qui est capable de créer des cassures de l'ADN simple brin et par

conséquent d'activer la PARP. L'activation de la PARP conduit à une déplétion cellulaire délétère en NAD⁺ correspondant à une « crise énergétique » qui a pour conséquence de ralentir la glycolyse, le transport d'électrons et la formation d'ATP. La PARP joue par ailleurs un rôle modulateur sur l'activation du facteur transcriptionnel NFκB. L'implication de la PARP dans la dysfonction endothéliale au cours du diabète repose sur des travaux expérimentaux récents. *In vitro*, il n'est pas observé de dysfonction endothéliale sur des anneaux d'aorte thoracique soumis à une forte concentration en glucose de souris Ko PARP^{-/-} ou de souris PARP^{+ /+} traitées par inhibiteur de PARP (Soriano F et coll., 2001a). Chez la souris PARP^{-/-}, il n'est pas observé de dysfonction endothéliale liée au diabète. Le traitement par inhibiteur de la PARP est par ailleurs capable de prévenir les anomalies de la vasorelaxation endothélium-dépendante chez la souris STZ (Pacher P et coll., 2002) et de les restaurer après quelques jours de traitement (Soriano F et coll., 2001b). Enfin, l'activation de la PARP a été observée sur biopsie cutanée de patients DT2 mais aussi de patients à risque de diabète (antécédents familiaux, intolérants au glucose). Chez ces patients, elle est associée à des anomalies de la vasomotricité brachiale et à des anomalies microcirculatoires (Pacher P et coll., 2005).

1.3. Interaction AGE-RAGE

La cellule endothéliale est exposée aux AGEs à la fois par son pôle basal et à sa surface luminale, elle constitue donc une cible majeure des AGEs (Figure 18). L'implication des AGEs dans le développement de l'athérosclérose et dans les anomalies fonctionnelles de l'endothélium est démontrée au cours du diabète (Wautier JL et coll., 2004). Le rôle des AGEs dans les anomalies de vasorelaxation endothélium-dépendante reste toutefois discuté.

1.3.1. RAGE et Athérosclérose

Le rôle de RAGE dans le développement de l'athérosclérose a initialement été démontré chez la souris KO apo E streptozotocine. Un traitement par RAGE soluble administré quotidiennement réduit significativement de manière dose dépendante le nombre et la complexité des plaques d'athérosclérose chez ces souris (Park L et coll., 1998). Parallèlement, l'expression de VCAM, du facteur tissulaire, la translocation de NFκB et le dépôt d'AGEs sont significativement diminués sur l'aorte des souris traitées. Des résultats

similaires ont été observés dans un modèle de souris DT2 Ko apoE (**Bucciarelli LG et coll., 2002**).

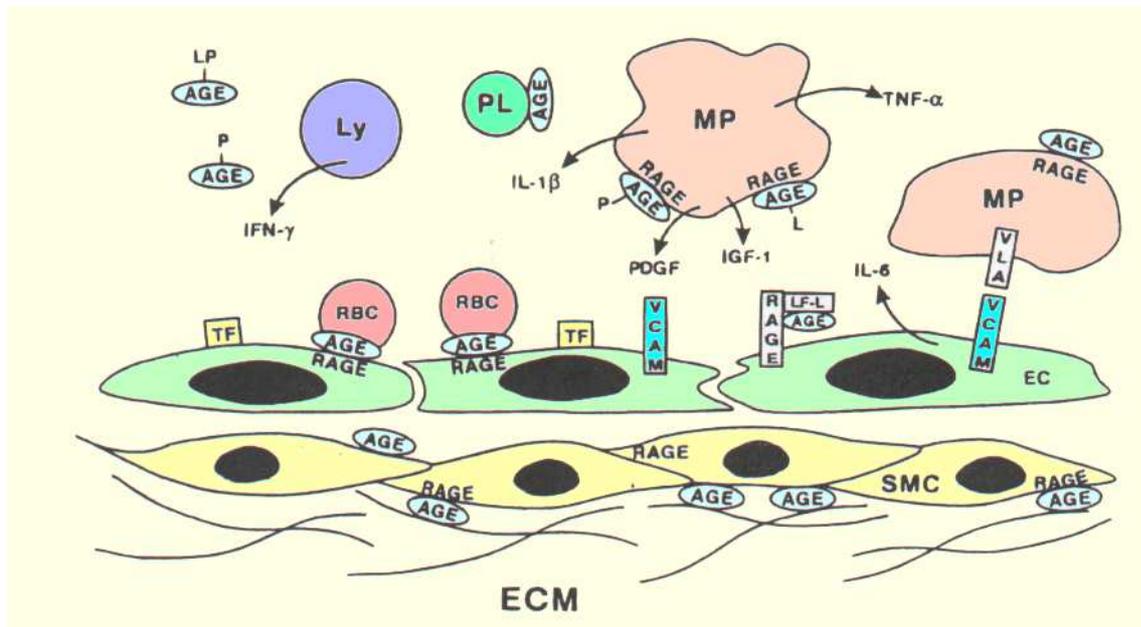


Figure 18. Interactions des AGEs avec les éléments sanguins
d'après **Chappay O et coll., 1997**.

AGE-P, AGE-LP: protéines et lipoprotéines glyquées, EC: cellule endothéliale, ECM: matrice extracellulaire, IFN-gamma: interféron gamma, IGF-1: insulin-like growth factor, IL: interleukine, LF-L: lactoferrin-like receptor, Ly: lymphocyte, MP: monocyte, macrophage, PDGF: platelet-derived growth factor, PL: plaquette, RBC: érythrocytes, SMC: cellule musculaire lisse, TF: facteur tissulaire, TNF: tumor necrosis factor, VCAM: vascular cell adhesion molecule-1, VLA: very late antigen.

Egalement, le traitement par sRAGE peut stabiliser la progression de l'athérosclérose chez la souris KO apo E streptozotocine lorsqu'il est administré 14 semaines après l'induction du diabète (**Bucciarelli L et coll., 2002**).

Chez l'homme, il existe une surexpression de RAGE dans les plaques d'athérosclérose de patients diabétiques, plus spécifiquement au niveau des macrophages sur des plaques vulnérables. L'expression de RAGE est corrélée dans cette étude au niveau d'HbA1C (**Cippollone F et coll., 2003**).

Enfin, des travaux récents suggèrent une large implication des AGEs et de RAGE dans les mécanismes d'expansion néointimale postangioplastie chez l'animal diabétique mais également dans des modèles euglycémiques (**Zhou Z et coll., 2003**).

1.3.2. AGEs et RAGE dans la dysfonction endothéliale

Les anomalies fonctionnelles endothéliales liées à la liaison AGE-RAGE sont étendues car les voies de transduction de RAGE sont multiples via le stress oxydant avec comme effecteur l'activation du NFκB.

L'activation du NFκB participe à l'augmentation de la perméabilité vasculaire constatée dans la vasculopathie diabétique. En effet, l'albumine-AGE et les AGEs portés sur la membrane des érythrocytes favorisent le passage des macromolécules à travers la couche monocellulaire endothéliale (**Wautier JL et coll., 1996**). L'hyperperméabilité observée chez des rats diabétiques est en partie amendée par l'utilisation d'anticorps antiRAGE ou de RAGE soluble. Cette même étude a par ailleurs montré que l'hyperperméabilité vasculaire liée aux AGEs est prévenue *in vitro et in vivo* par l'administration d'antioxydants.

Les interactions AGE-RAGE sur la cellule endothéliale favorisent par ailleurs la synthèse de cytokines proinflammatoires. Chez la souris, l'infusion d'albumine-AGE entraîne très précocement (1h) une augmentation des ARNm IL6 dans le foie (**Zoukourian C et coll., 1996**). De plus, l'activation du NFκB conduit à une surexpression de VCAM qui favorise l'adhérence des monocytes sur l'endothélium (**Schmidt AM et coll., 1995**). La cellule endothéliale est aussi soumise à l'ensemble des cytokines secrétées par le macrophage lors de l'internalisation des AGEs. Ces cytokines telles que le TNFα, IL₁, PDGF et IGF1 sont impliquées dans la dysfonction endothéliale (figure 18).

Les AGEs augmentent l'expression endothéliale de certains facteurs tels que le Vascular endothelium growth factor (VEGF) (**Schmidt AM et coll., 1994**) et favorisent un état prothrombotique par augmentation de l'expression du facteur tissulaire, du plasminogen activator inhibitor -1(PAI₁) et diminution des prostacyclines (**Yamagishi S et coll., 1998**).

Enfin, les AGEs sont impliqués dans les anomalies de l'angiogénèse ; certains facteurs de croissance comme le fibroblast growth factor 2, s'ils sont glyqués, sont moins actifs (**Facchiano F et coll., 2002**).

L'implication des AGEs dans les anomalies de vasorelaxation relève du travail initial de Bucala qui a montré que les AGEs sont capables *in vitro* de manière dose dépendante d'inhiber l'activité du NO par un phénomène de piège (quenching) (**Bucala R et coll., 1991**). Parallèlement, l'auteur décrit, dans un modèle de vasomotricité artérielle chez le rat diabétique, une diminution de la relaxation induite par l'acétylcholine et par la nitroglycérine suggérant ainsi que la perte de la vasorelaxation artérielle relève d'un phénomène post-endothélium. L'auteur émet l'hypothèse alors de l'implication des AGEs du sous-endothélium dans les anomalies de vasorelaxation. L'aminoguanidine, inhibiteur de la formation des

AGEs, administrée oralement aux rats diabétiques améliore significativement dans ce modèle la vasorelaxation à l'acétylcholine et à la nitroglycérine.

Des résultats similaires sont observés en utilisant le même modèle de vasomotricité chez des rats non diabétiques traités par injection d'albumine-AGE quotidienne pendant 14 jours (**Vlassara H et coll., 1992**). Le groupe de rats traités par albumine-AGE et aminoguanidine (100mg/kg/J iv) présente une amélioration significative de la vasorelaxation à l'acétylcholine et à la nitroglycérine.

Xu a rapporté récemment que, l'incubation d'AGE-glutamine à différentes concentrations (50-200µg/l) sur des anneaux aortiques de lapins altère, de manière dose-dépendante, la vasorelaxation à l'acétylcholine sans modifier la vasomotricité à la nitroglycérine. Après lavage, la vasorelaxation de ces anneaux est restaurée et n'est pas différente de celle des anneaux contrôles. La co-incubation d'AGE-glutamine et d'un anticorps antiCML prévient les anomalies de la vasorelaxation induites par l'acétylcholine. L'auteur rapporte parallèlement que l'administration *in vivo* de 200mg/kg d'AGE-glutamine abolit la vasorelaxation NO dépendante après un stress d'étirement sur artère fémorale de lapin. Enfin, le traitement de cellules HUVEC par AGE-glutamine réduit l'activité d'eNOS en diminuant la phosphorylation des sérines. La co-incubation avec un anticorps antiCML ou anti-RAGE prévient cet effet (**Xu B et coll., 2003**).

Cependant l'implication des AGEs dans les anomalies de vasorelaxation reste discutée. Tout d'abord, il existe des discordances entre la cinétique de la dysfonction endothéliale et celle des AGEs. L'observation d'une dysfonction endothéliale *in vitro* dès 15 minutes d'exposition à une forte concentration de glucose (**Bohlen H et coll., 1993**) ne plaide pas en faveur de l'implication des AGEs, en particulier dans l'hypothèse de Bucala sur le rôle des AGEs progressivement accumulés dans le sous-endothélium. Egalement, les anomalies de vasorelaxation observées chez le rat streptozotocine sont corrigées par un court traitement par insuline, alors même que les concentrations d'AGEs restent élevées (**Rodriguez-Manas L et coll., 2003**).

L'efficacité de l'aminoguanidine (AG) dans la prévention des complications chroniques du diabète telles que la néphropathie, la rétinopathie et la neuropathie est largement documentée dans la littérature (**Thornalley PJ et coll., 2003**). Le rôle protecteur de l'AG vis-à-vis de la relaxation endothélium-dépendante fait l'objet de controverses. Si certains travaux ont montré une prévention des anomalies de vasorelaxation par l'AG (**Archibald V et coll., 1996 ; Bucala R et coll., 1991 ; Ozyagzan S et coll., 2000 ; Vlassara H et coll., 1992**), d'autres n'ont montré aucun effet bénéfique (**Crijns F et coll., 1998 ; Rodriguez-Manas L et coll.,**

2003 ; Vallejo S et coll., 2000). L'AG est un composé nucléophile qui comporte un radical hydrazine et un groupe guanidine. La molécule se comporte comme un « scavenger » des composés $\alpha\beta$ dicarbonyls limitant ainsi la formation des AGEs notamment via la voie de synthèse du méthyl-glyoxal (**Thornalley PJ et coll., 2003**).

Ces divergences pourraient résulter de protocoles expérimentaux différents concernant les doses utilisées, les durées de traitement, les lits vasculaires étudiés. En effet les mécanismes d'action de l'AG ne se limitent pas à la réduction de synthèse des AGEs. En fonction des concentrations tissulaires, l'AG peut inhiber les NOS préférentiellement la NOS inducible et, à un moindre degré, la NOS neuronale et endothéliale voire la NOS découplée limitant ainsi le stress oxydant (**Thornalley PJ et coll., 2003**), ceci peut donc naturellement interférer et expliquer partiellement les résultats contradictoires de l'AG sur la vasorelaxation.

2. OBJECTIF DE NOTRE TRAVAIL

Notre travail soulève l'hypothèse d'une implication des AGEs et de RAGE dans un stade précoce de complication vasculaire du diabète représentée par la dysfonction endothéliale.

Premièrement, nous avons déterminé l'évolution au cours du diabète de la fonction endothéliale par analyse de la vasorelaxation aortique en chambre d'organe isolé sur un modèle expérimental de diabète insulino-prive, obtenu par injections de streptozotocine sur des souris mâles C57B/6J. Nous avons évalué conjointement la cinétique des AGEs plasmatiques par technique ELISA et l'expression aortique de RAGE par technique de Western Blot. Les anomalies fonctionnelles vasculaires ont également été confrontées aux données morphologiques de l'aorte. Enfin, l'effet de l'AG sur les anomalies vasculaires a été analysé.

Le choix de la souris C57B/6J streptozotocine comme modèle expérimental repose sur les éléments suivants. Il s'agit d'un modèle largement utilisé dans la littérature pour l'analyse des complications vasculaires liées au diabète, son coût est faible, et la reproductibilité relativement satisfaisante. Les données de vasomotricité artérielle chez la souris sont assez parcellaires dans la littérature contrairement à l'étude chez le rat, cependant le modèle de la souris a été retenu car d'une part la technique était acquise au sein du laboratoire de

pharmacologie, et d'autre part l'analyse chez la souris permet d'envisager par la suite l'utilisation des modèles transgéniques.

3. MATERIEL ET METHODES

3.1. Animaux

Toutes les manipulations animales menées dans cette étude ont été conduites conformément aux recommandations internationales concernant l'utilisation des animaux d'expérimentation. Des souris mâles C57B/6J (Elevage Janvier, Mayenne) âgées de 6 à 8 semaines étaient hébergées à l'animalerie de la Faculté de Médecine de Lille dans un environnement maintenu à 21°C avec alternance jour/nuit de 12 heures, un taux d'humidité de 50 à 60% et un accès libre à l'eau et à la nourriture composée de granulés standards. Après une période d'acclimatation de quinze jours, les protocoles expérimentaux débutaient.

3.2. Protocole (Figure 19)

Le diabète était induit par une injection intrapéritonéale de 180 mg.kg⁻¹ streptozotocine (Sigma, S-O130) diluée dans un tampon citraté à pH 4,5. Après 72 heures, un contrôle glycémique était réalisé par prélèvement sanguin caudal à l'aide d'un lecteur glycémique (euroflash, lifescan). Si la glycémie était inférieure à 200 mg/l, les souris étaient ré-injectées. La durée du diabète en fonction des groupes variait de 2 à 8 semaines.

Le jour du sacrifice, le poids, la glycémie à jeun, l'hémoglobine glyquée (HPLC) étaient évalués.

Le sacrifice était réalisé par anesthésie profonde de 200mg/kg de thiopental (Pentobarbital sodique à 2% ; Sanofi animal) en injection intra péritonéale. Un prélèvement sanguin intracardiaque était pratiqué puis une incision sous diaphragmatique transversale et une thoracotomie bilatérale étaient réalisées.

Après une anesthésie profonde induite par une injection intrapéritonéale de 0,3ml de pentobarbital à 6% (Ceva Santé animal, Libourne, France), une incision sous diaphragmatique transversale et une thoracotomie bilatérale étaient réalisées. Puis l'aorte thoracique était prélevée cœur battant et immédiatement plongée dans une solution de Krebs (en mM/l) : NaCl 118 ; KCl 4.6 ; NaHCO₃ 27.2 ; MgSO₄ 1.2 ; KH₂PO₄ 1.2 ; CaCl₂ 1.75 ; Na₂ EDTA 0,026, d-glucose 11.1, de pH compris entre 7.35 et 7.40 et oxygénée (O₂ 95% et CO₂ 5% ; Air Liquide Santé™).

3.3.2. Préparation des anneaux aortiques

Après avoir rapidement purgé le contenu de la lumière artérielle avec la solution de Krebs, une dissection minutieuse sous stéréomicroscope (Stemi 200-C, Zeiss™) permettait de séparer le segment artériel de son tissu conjonctivo-graisseux. Deux anneaux de 3 à 4 mm de longueur étaient coupés à partir de la partie proximale de l'aorte thoracique.

3.3.3. Installation des anneaux

Chaque anneau était ensuite monté entre deux étriers métalliques passés à travers la lumière vasculaire puis suspendu de manière aléatoire dans une chambre des 4 chambres d'organe (Radnoti™ Glass Technology, Monrovia, CA, USA) contenant 20 ml de solution de Krebs chauffée à 37°C et oxygénée (O₂ 95% et CO₂ 5%). L'étrier inférieur était fixe ; le supérieur mobile et relié à un transducteur de force (Radnoti™). Les transducteurs étaient connectés à une carte informatique (Flash 12™, Strawberry Tree Incorporated) permettant la transformation et l'amplification des signaux analogiques en signaux digitaux. Ceux-ci étaient convertis en gramme de tension et visualisés en temps réel sous forme de courbes sur un écran grâce à un logiciel d'acquisition (Workbench PC® Strawberry Tree Incorporated) et de contrôle des données (enregistrement toutes les 10 s).

3.3.4. Protocole d'étude de la vasomotricité

Une fois installés, les segments artériels étaient progressivement étirés en 20 à 40 minutes jusqu'à obtenir une tension de repos optimale ou resting level (RL). Cette tension de repos a été préalablement définie à 1.5 g et correspond à la tension de base permettant une contraction maximale en réponse à une solution de KCl 3mM. Ensuite ces segments artériels étaient

stabilisés pendant 60 min au RL. Une contraction initiale était obtenue par administration d'une solution dépolarisante de KCl à 10^{-3} M qui permettait de vérifier la viabilité de l'anneau. Chaque cuve était alors rincée 3 fois de suite avec la solution de Krebs. La tension de chaque anneau était ensuite ramenée au RL et maintenue pendant 30 min. Les anneaux étaient alors exposés à des doses croissantes de phényléphrine, agent contractant récepteur-dépendant (10^{-9} à 3.10^{-4} M) pour établir une courbe dose/réponse en contraction. Pour chaque concentration de phényléphrine, un plateau de contraction était attendu avant de passer à la concentration supérieure. Après obtention d'un plateau de contraction maximale, des doses croissantes d'acétylcholine (10^{-9} à 3.10^{-5} M), agent relaxant endothélium-dépendant récepteur-dépendant, étaient administrées pour tester la relaxation endothélium-dépendante. Après rinçage abondant et une stabilisation de la tension de l'anneau au RL pendant 30 min, une seconde contraction du segment était obtenue avec une dose unique de phényléphrine à 3.10^{-6} . La relaxation endothélium-indépendante était étudiée par l'application de doses croissantes de nitroprussiate de sodium (SNP 10^{-9} à 3.10^{-5} M).

3.4. Etude anatomopathologique de l'aorte

Le sacrifice a été réalisé par anesthésie profonde après injection intrapéritonéale de Pentobarbital. Après le sacrifice, le cœur était perfusé par du sérum physiologique hépariné (héparine choay® 5000 UI/l). L'aorte thoracique était prélevée après décoloration des organes puis était plongée dans une solution de formol à 4%. Le temps de fixation était de 48 H minimum. Après déshydratation et enrobage dans un automate (TP 1050 LEICA®), les échantillons étaient inclus en paraffine (Paraplast®).

3.4.1 Coupes

Des coupes de 4 μ m d'épaisseur ont été effectuées sur un microtome LEICA® N n° 2135. Elles ont été étalées sur un bain d'eau distillée additionnée de Stick – on chauffé à 37°, étalées sur des lames super- Frost® puis mises à sécher au four micro ondes pendant 10 min à 250 watts.

2 coupes étaient réalisées pour chaque coloration histochimique.

5 à 6 souris dans chaque groupe ont été analysées.

3.4.2. Colorations standards et histochimiques

Les colorations étaient effectuées après déparaffinage au xylène et réhydratation.

Des Coloration hémateïne, érythrosine, safran (HES), à l'orcéine, au Bleu alcian, au Rouge Sirius, au trichrome vert de Masson ont été réalisés selon les mêmes techniques que celles employées dans l'étude du vieillissement artériel lié à l'âge. (cf p 41).

3.4.3 Techniques immunohistochimiques

L'étude immunohistochimique avec anticorps anti- actine lisse (DAKO[®] MO8851) a été faite selon une technique identique à celle employée dans l'étude du vieillissement artériel lié à l'âge. (cf p 42).

3.5. Dosages plasmatiques des AGEs

Les principales étapes de ce dosage sont :

- la préparation des protéines glyquées : incubation à l'obscurité, à 37°C durant 60 jours de serum albumine humaine avec une solution de glucose.
- Obtention d'anticorps polyclonaux anti AGE après injections répétées de la solution précédente à des poules : IgY préparée par précipitation différentielle au polyéthylène-glycol puis purifiée par un traitement cryogénique et par l'alcool.
- Mesure des AGEs par méthode ELISA compétitive : résultats exprimés en % de densité optique (rapport de densité optique sur densité optique étalon). Conversion des unités en µg/ml.

3.6. Analyse en Western-Blot de l'expression de RAGE.

3.6.1. Extraction des protéines

L'extraction des protéines était réalisée par broyage de l'aorte congelée avec un pilon et un mortier puis la poudre obtenue est mélangée à du tampon RIPA (1 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 1 % DOC, 0.1 % SDS, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.25 et du PMSF 1mM) associé à des inhibiteurs de protéases et du SDS, puis sonification de la solution obtenue (Sonifier 150, BRANSON).

3.6.2. Dosage des protéines

Le dosage des protéines était réalisé par la méthode de Peterson. Les prélèvements étaient aliquotés pour des dépôts de 25µg de protéines et conservés à -80°C.

3.6.3. Western-Blot

Les prélèvements étaient déposés dans un gel de SDS-PAGE à 10% d'acrylamide, après dénaturation par du β mercapto-éthanol et chauffage à 95°C pendant 5 minutes.

Après migration des protéines selon leur poids moléculaire dans un tampon de migration (25mM Tris, 192mM Glycine, 0.1% SDS pH 8.3) à 180V pendant 1 heure, elles étaient transférées sur une membrane de nitrocellulose ECL (Amersham) dans un semi-dry blotter à 10V pendant 2h, avec un tampon de transfert (100ml de 25mM Tris/192mM Glycine/pH 8.3, 200ml éthanol, 700ml d'eau désionisée).

Les protéines étaient révélées par un bain de rouge Ponceau, puis les membranes étaient découpées en 4 bandes selon leur poids moléculaire avec l'aide du témoin de masse (Bio-rad), puis rincées dans du PBS. Les membranes étaient ensuite immergées pendant 30 minutes dans du lait à 5%.

Une incubation avec l'anticorps primaire dilué dans du lait à 5% était réalisée sur la nuit à 4°C.

Après un lavage dans du PBS (3*15 minutes) puis un blocage dans du lait à 5%, l'anticorps secondaire (anticorps anti IgG conjugué à de la peroxydase de radis noir (horse raddish peroxydase : HRP)) était déposé et laissé à incuber 3 heures.

Après rinçage dans du PBS (5*10 minutes), la révélation était réalisée par dépôt d'ECL puis exposition sur film (Hyperfilm ECL) en chambre noire.

3.6.4. Analyse comparative des protéines

L'analyse comparative des protéines était effectuée à l'aide du logiciel PerfectImage v7.1, après numérisation des films sur scanner AGFA. Les résultats étaient exprimés en unités arbitraires, sous forme de ratio par rapport à l'expression d'actine.

3.6.5. Anticorps

Anticorps primaires :

-Anti-RAGE: rabbit polyclonal IgG ab3611 (Abcam Ltd, Cambridge, UK)

-Anti-Actine : rabbit universal polyclonal IgG (Sigma)

Anticorps secondaires:

-Anti-goat : rabbit anti-goat HRP-conjugated IgG PI-9500 (Vector Labs)

3.7. Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés sous forme de pourcentages ou de valeurs moyennes \pm l'erreur standard. Les comparaisons de moyenne ont été effectuées par une analyse de variance (ANOVA) suivie, en cas de différences significatives, d'une analyse post-hoc par le test PLSD (*protected least significant difference*) de Fisher. Le seuil de significativité pour les tests statistiques était de 5 % ($p < 0,05$). Les réponses de vasoconstriction à la phényléphrine étaient exprimées sur les courbes en pourcentage de contraction par rapport à celle induite par 75 mM KCl, les réponses de vasodilatation étaient exprimées par rapport à la contraction maximale à la phényléphrine.

4. RÉSULTATS

4.1. Article : Endothelium-dependent vasodilatation impairment is linked to AGEs and RAGE expression in diabetic mice: beneficial effect of aminoguanidine.

4.2. Etude histomorphologique

- **Souris âgées de 10 semaines non diabétiques**

Sur les coupes transversales réalisées au niveau de l'aorte médiane, les endothéliums sont préservés. L'intima-média n'apparaît pas épaissie (figure 20 a,d).

La média, bien objectivée par la coloration à l'orcéine (figure 22 a), est constituée de 5 lames élastiques. Ces lames sont parallèles et d'épaisseur égale et constante. Tout au plus, on peut observer de très petites zones où les lames élastiques sont discrètement désorganisées perdant leur parallélisme.

Il n'existe pas de dépôts colorés par le bleu alcian (figure 21 a). La coloration au rouge Sirius qui objective les fibres de réticuline (collagène de type III) est homogène sur toute la paroi vasculaire en un liseré continu appliqué contre les lames élastiques (figure 23 a).

L'immunomarquage de l'actine lisse est fortement positif et homogène (figure 25 a).

Conclusion :

Les souris âgées de 10 semaines non diabétiques ne présentent pas d'anomalies morphologiques significatives de la paroi aortique.

- **Souris 4 semaines de diabète**

L'épaisseur de l'intima-média est significativement augmentée par rapport à celle des souris 10 semaines ($64 \pm 9 \mu\text{m}$ versus $50 \pm 3 \mu\text{m}$, $p=0.01$) (figure 26).

Sur les colorations HES, l'endothélium est préservé, sans altération de l'intima (figure 20 b, c). On note 5 à 6 lames élastiques qui restent majoritairement parallèles et organisées (figure 22, b). Cependant, il existe des zones très focalisées où les lames perdent leur parallélisme et de discrètes zones de clarification de la matrice extra-cellulaire (figure 21 b). Les zones de clarification correspondent à des dépôts alcianophiles bien authentifiés par la coloration bleu alcian (figure 21 b). La coloration au trichrome de Masson objective quelques zones de fibrose pariétale (figure 24 b).

Le réseau réticulinique est préservé apparaissant comme un fin surlignement des lames élastiques avec la coloration Sirius (figure 23 b).

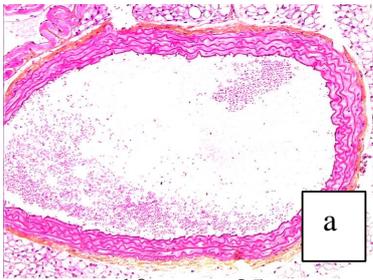
Le réseau d'actine lisse perd son caractère homogène avec un immunomarquage inégalement réparti, une coloration hétérogène, des zones de clarification assez nettes (figure 25 b).

Conclusion :

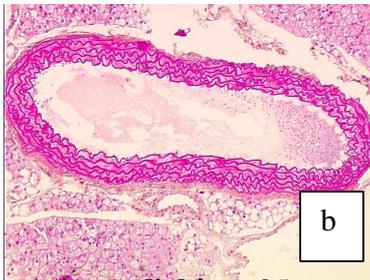
Les souris 4 semaines de diabète présentent :

- un épaissement de l'intima-média,
- des anomalies focales de la média caractérisées par une désorganisation des fibres élastiques,
- des dépôts alcianophiles dans la matrice extracellulaire
- une altération focalisée du réseau actinique.

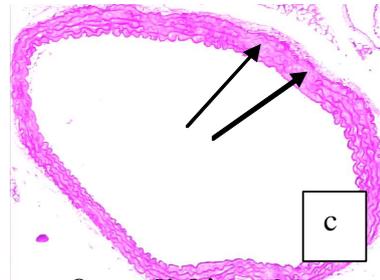
COLORATION HES (Figure 20)



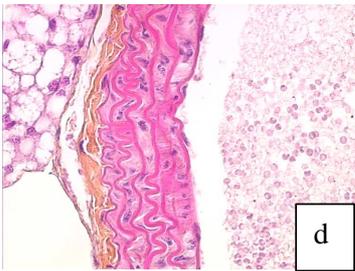
10 sem x25



4 sem diabète x25



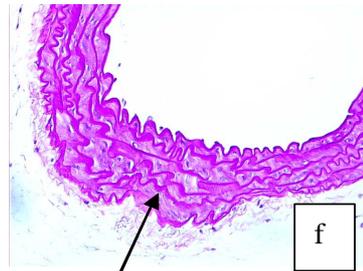
8sem diabète x25



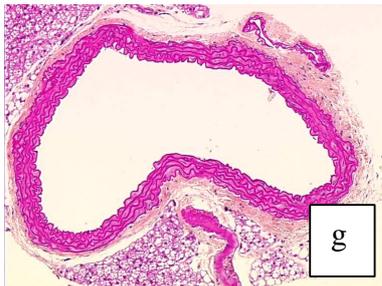
10 sem x100



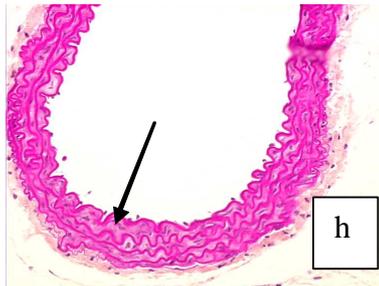
4 sem diabète x100



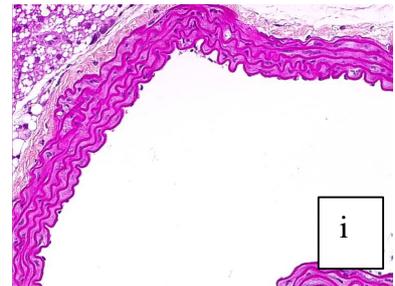
8 sem diabète x100



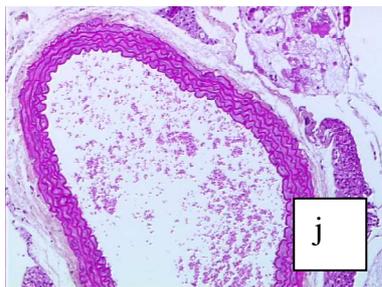
AMG 4sem x25



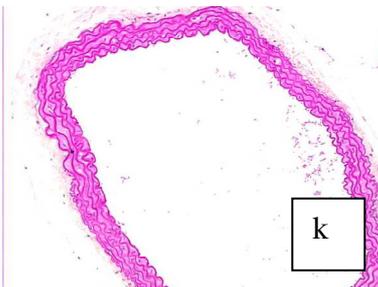
AMG 4sem x25



AMG 4sem x25

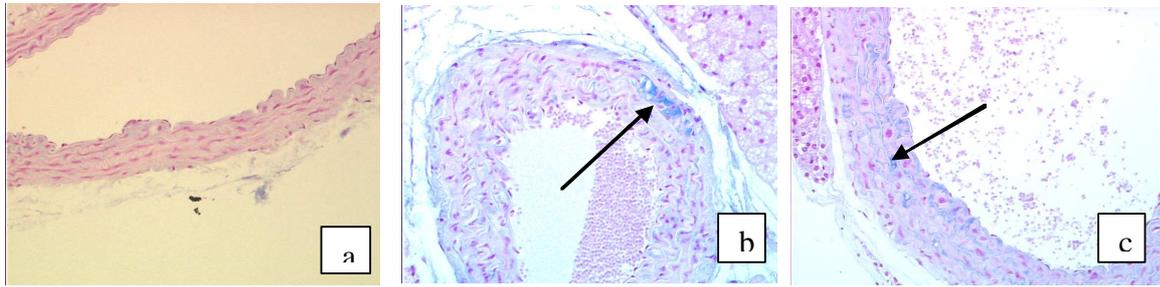


AMG 8sem x25



AMG 8sem x25

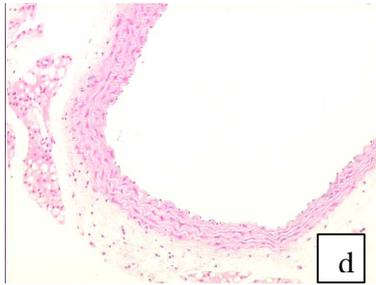
COLORATION BLEU ALCIAN (figure 21)



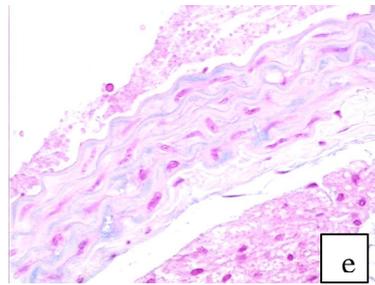
10sem x25

4sem diabète x25

8sem diabète x25

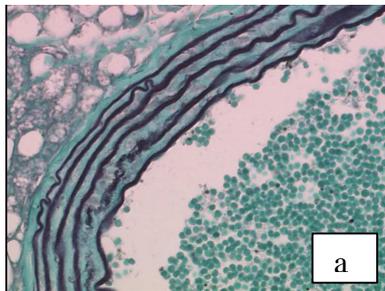


AMG 4sem x25

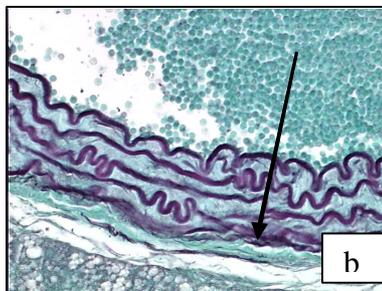


AMG 8sem x100

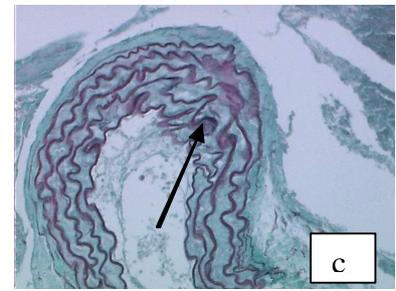
COLORATION ORCEINE (figure 22)



ND

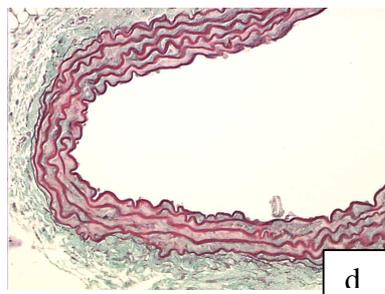


4 WD

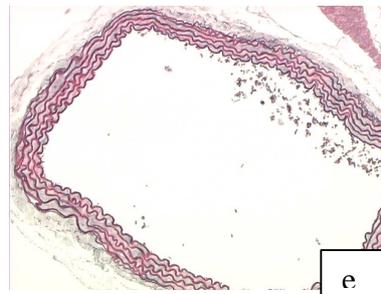


8 WD

a

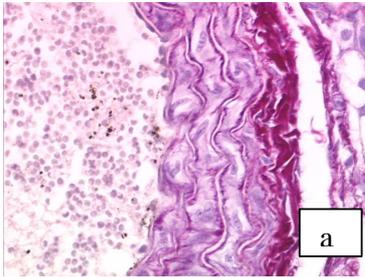


AMG 4 sem x25

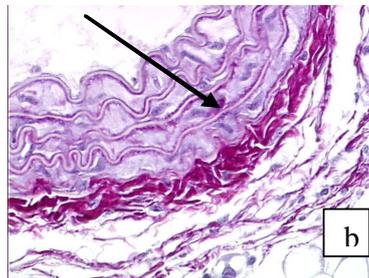


AMG 8 sem x25

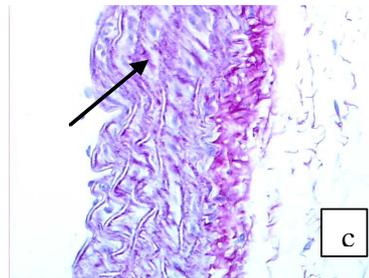
COLORATION SIRIUS (figure 23)



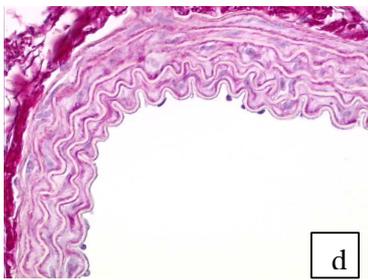
10 sem x160



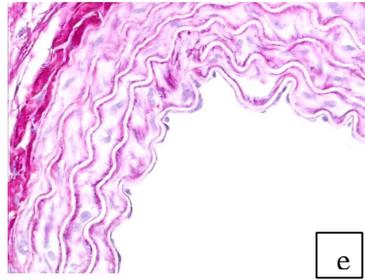
4 sem diabète x160



8 sem diabète x160

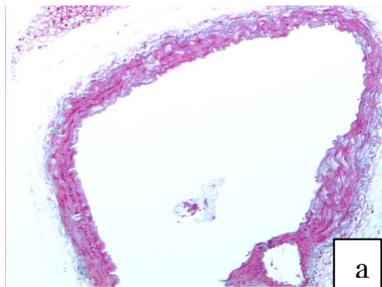


AMG 4 sem x100

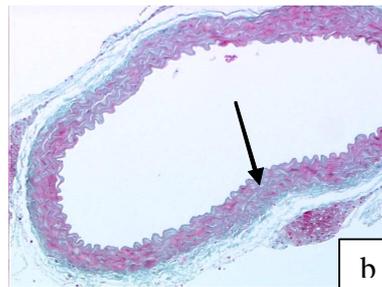


AMG 8 sem x100

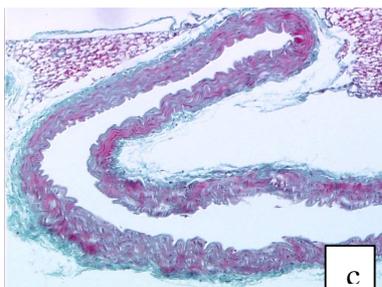
COLORATION TRICHROME DE MASSON (figure 24)



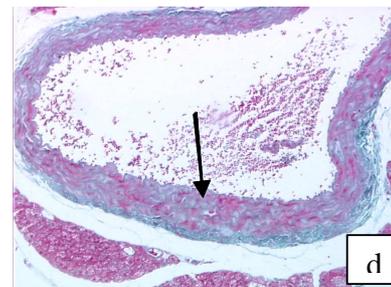
4 sem diabète x25



8 sem diabète x25

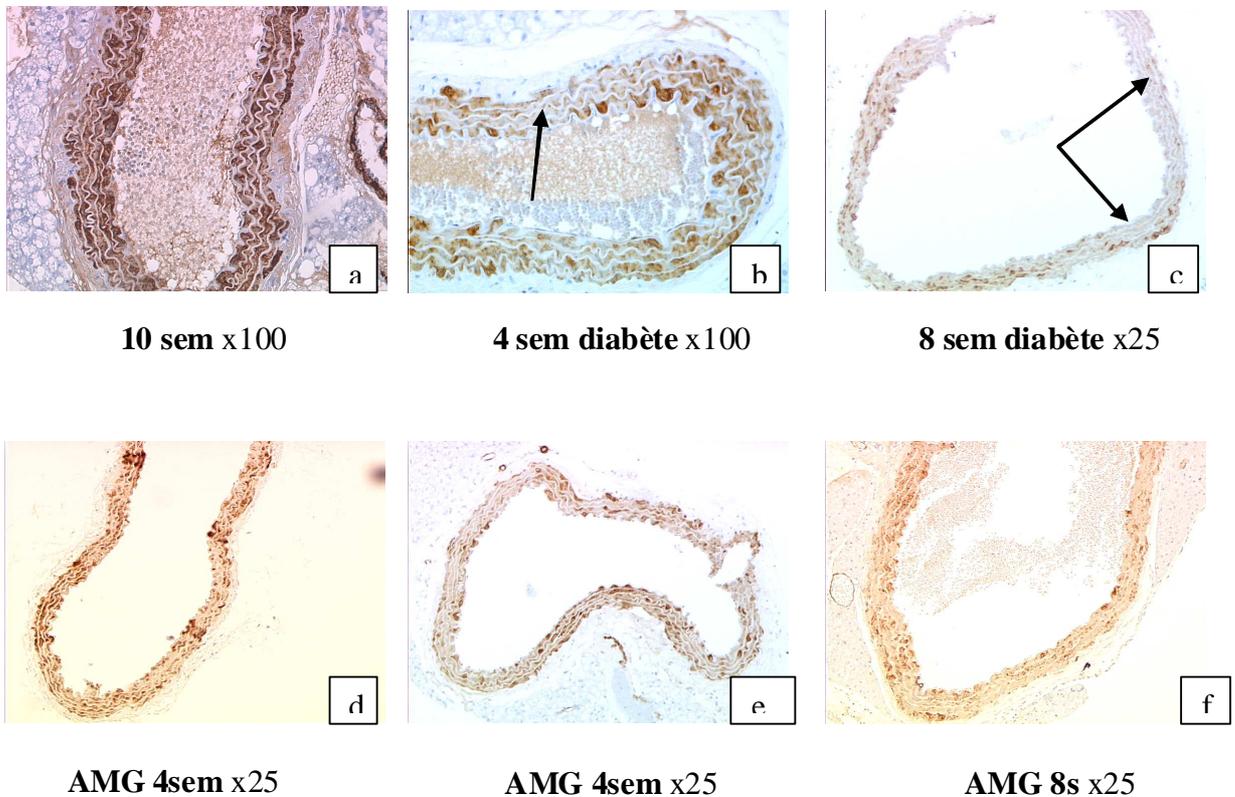


AMG 4 sem x25



AMG 8 sem x25

IMMUNO MARQUAGE: ACTINE LISSE (figure 25)



- **Souris 8 semaines de diabète**

L'endothélium est préservé. La paroi aortique est également épaissie par rapport aux souris non diabétiques ($62.5 \pm 3 \mu\text{m}$, $p=0 < 0.01$, figure 26). Sur les colorations HES, il existe des zones de clarification de la matrice extracellulaire plus étendues que chez la souris 4 semaines de diabète (figure 20 c ? f). Ces zones se caractérisent également par des anomalies des lames élastiques qui semblent gommées, plus fines, perdant leur parallélisme parfois même anastomosées (figure 22 c). Les dépôts alcianophiles sont présents (figure 21 c). Le réseau réticulinique est fortement altéré prenant parfois une disposition perpendiculaire aux lames élastiques, il disparaît même dans certaines zones. Le rouge Sirius diffuse entre les lames élastiques, le surlignement des lames élastiques est irrégulier (figure 23 c). La fibrose observée aux colorations du trichrome de Masson s'accroît sur certains secteurs de la média (figure 24 c). L'immunomarquage avec l'immun sérum anti actine lisse n'est positif que sur certains secteurs de la média (figure 25 c).

Conclusion :

Les souris 8 semaines de diabète présentent :

- un épaissement de l'intima-média,
- des anomalies plus étendues de la média caractérisées par une désorganisation des fibres élastiques,
- une altération marquée du réseau réticulinique, une désorganisation du collagène, une accentuation de la fibrose, des dépôts au bleu alcian,
- une altération très diffuse du réseau d'actine lisse.

- **Souris diabétiques 4 semaines et traitées par aminoguanidine**

L'épaisseur de la paroi aortique est diminuée par rapport à celle des souris diabétiques 4 semaines de diabète non traitées ($53 \pm 2.4 \mu\text{m}$ versus $64 \pm 9 \mu\text{m}$, $p=0.05$, figure 26). Il existe de discrètes zones de clarification de la matrice extracellulaire mais plus nettement focalisées que chez la souris non traitée (figure 20 g, h). Sur les colorations par l'orcéine, il persiste quelques zones d'altérations des fibres élastiques (figure 22 d). Il n'existe quasiment pas de dépôts alcianophiles (figure 21 d). Le réseau réticulinique n'est pas altéré (figure 23 d), le marquage d'actine lisse reste inhomogène mais moins que dans la série de souris diabétiques 4 semaines (figure 25 d).

Conclusion :

Les souris 4 semaines de diabète traitées par l'aminoguanidine présentent peu d'anomalies pariétales :

- pas d'épaississement intima-média
- quelques anomalies focalisées de la média caractérisées par une désorganisation minime des fibres élastiques,
- désorganisation du réseau de l'actine lisse.

- **Souris diabétiques 8 semaines et traitées par aminoguanidine**

L'épaisseur de la paroi aortique est diminuée par rapport à celle des souris 8 semaines de diabète non traitées (figure 26). Sur la coloration HES, il existe toujours des zones de clarification de la matrice extracellulaire (figure 20 j, k), et une désorganisation focale des fibres élastiques (figure 22 e). Il existe quelques zones alcianophiles (figure 21e). Les fibres de collagène sont modérément désorganisées. Le réseau d'actine lisse est altéré mais moins que chez la souris non traitée (figure 25 e); également la fibrose sur la coloration au trichrome de Masson est moins prononcée (figure 24 d).

Conclusion :

Les souris 8 semaines de diabète traitées par l'aminoguanidine présentent

- quelques anomalies de la paroi aortique qui sont cependant moins nettes en comparaison avec les souris de 2 mois diabète non traitées
- un discret épaissement pariétal
- des anomalies focalisées de la média caractérisées par une désorganisation des fibres élastiques,
- une désorganisation du réseau d'actine lisse

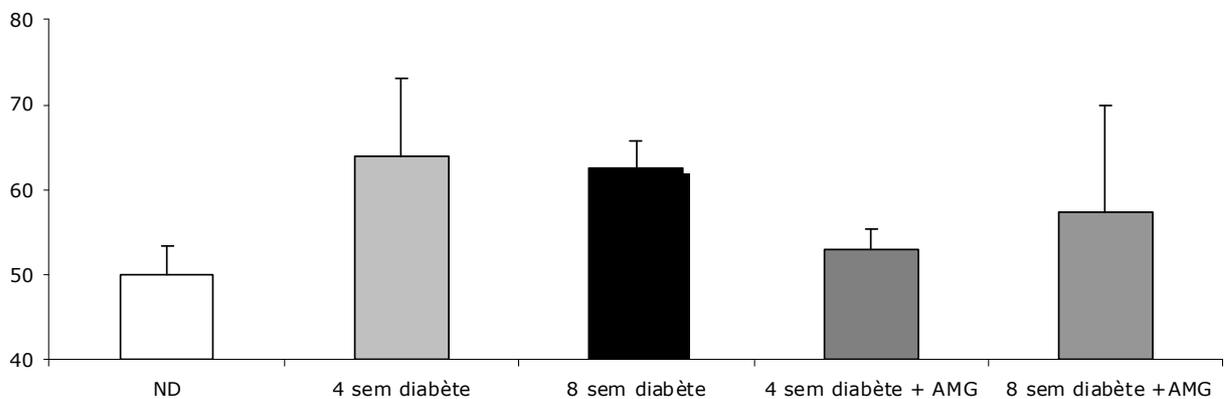


Figure 26. Epaisseur intima-média de l'aorte
en µm, *P<0.05 vs ND

	Témoin 10s	4 sem diabète	8 sem diabète	4 sem AMG	8 sem AMG
Etudes fonctionnelles					
Vasorelaxation maximale Endothélium-dépendante Emax ACH(%)	76	52	34	75	53
Vasorelaxation maximale Endothélium-indépendante Emax SNP (%)	121±5	169±16	157±21	147±12	159±16
Etude anatomo pathologique					
Coloration HES	paroi normale	altération focale Zone clarifiée	altération plus diffuse	pas d'altération	quelques zones focales clarifiées
Coloration Alcian dépôts MPS	0	++	+	0	0
Coloration Orcéine désorganisation des LE	0	++	+++	+	+
Coloration Sirius Fibres collagènes	normales	normales	épaissies, inhomogenes perpendiculaires	normales	qq zones inhomogènes
Trichrome de Masson Fibrose	0	+	+++	+	+
Marquage Actine lisse	+++	++	+, inhomogène	++	++

Tableau 8. Récapitulatif des données de vasomotricité et d'histomorphologie.

5. DISCUSSION

Les complications vasculaires représentent la première cause de mortalité dans la population diabétique ; améliorer la prévention vasculaire demeure donc une nécessité. L'analyse des stades initiaux du diabète et de ses complications vasculaires est indispensable pour développer des marqueurs précoces tels que la dysfonction endothéliale et potentiellement des cibles thérapeutiques.

Nos résultats plaident en faveur d'une altération progressive de l'artère diabétique tant sur le plan fonctionnel et morphologique et d'une implication des AGEs dans ce processus. En effet, la diminution de la relaxation endothélium-dépendante observée à 4 semaines de diabète dans notre modèle est associée à une augmentation significative des AGEs et de RAGE et l'aminoguanidine, inhibiteur de la synthèse des AGEs, restaure la dysfonction endothéliale avec une diminution de l'expression de RAGE. L'augmentation des AGEs et de RAGE sur l'aorte au cours du diabète est connue (**Sun M et coll., 1998**). Notre travail établit le lien en termes d'évolutivité entre d'une part, des anomalies morphologiques et fonctionnelles aortiques et d'autre part, les AGEs plasmatiques et l'expression de RAGE. Ceci est concordant avec l'étude de Tan et coll qui rapporte chez des patients DT2 qu'un taux élevé d'AGEs plasmatiques est significativement associé à une dysfonction endothéliale évaluée par échographie doppler sur l'artère humérale (**Tan K et coll, 2002**).

La controverse sur l'implication des AGEs dans les anomalies de vasorelaxation est alimentée par l'efficacité inconstante de l'AG dans les études et par des cinétiques potentiellement différentes entre les AGEs à la cinétique lente et la dysfonction endothéliale, complication précoce. L'efficacité inconstante de l'AG peut être expliquée, comme nous l'avons vu, par les doses utilisées, significativement différentes en fonction des études. En effet, l'influence de l'AG sur les NO Synthases (NOS) est concentration dépendante, une concentration élevée est capable d'inhiber la NOS endothéliale et par conséquent de diminuer la disponibilité du NO. Concernant les différences de cinétique, les connaissances biochimiques actuelles ont beaucoup évolué et suggèrent que la production des AGEs peut être très rapide, en quelques heures, par les phénomènes d'oxydation (**Brownlee M et coll, 2001**) ainsi il n'y a plus vraiment d'incompatibilité entre la cinétique des AGEs et celle de la dysfonction endothéliale.

Les mécanismes physiopathologiques pouvant expliquer le rôle des AGEs dans les anomalies de vasorelaxation sont d'une part, la participation des AGEs du sous-endothélium dans le

phénomène de quenching du NO (**Buccala R et coll, 1991**) et d'autre part, la contribution des AGEs, via l'interaction AGE-RAGE au stress oxydant. La formation de radicaux libres liée à l'interaction AGE-RAGE est bien établie et fait intervenir la NADPH oxydase (**Wautier MP et coll., 2001**). L'impact des radicaux libres sur la biodisponibilité du NO est fondamental et c'est sans doute au vu des données récentes de la littérature via le stress oxydant que le système AGE-RAGE agit principalement dans les anomalies de vasorelaxation endothélium-dépendante.

Les anomalies histomorphologiques observées sur notre modèle au décours du diabète comprennent l'épaississement intima-média, une augmentation des dépôts de glycosaminoglycanes, un remodelage de la matrice extracellulaire avec fragmentation, désorganisation des lames élastiques et augmentation des taux de fibres de collagène, et désorganisation du réseau d'actine lisse. Il existe peu de données dans la littérature sur l'analyse histomorphologique de l'aorte chez l'animal streptozotocine, les résultats sont d'ailleurs parfois contradictoires. Notre travail démontre que les anomalies de vasorelaxation présentes à partir de 4 semaines de diabète sont associées à des anomalies histomorphologiques significatives et qu'il existe une excellente concordance entre ces anomalies, de sorte que la souris diabétique 4 semaines présente une dysfonction endothéliale avec diminution de la vasorelaxation endothélium-dépendante, un épaississement intima-média et des dépôts de glycosaminoglycanes aortiques.

L'épaississement intima-média résulte dans notre étude essentiellement d'une augmentation de la média car au microscope photonique il n'a pas été possible d'observer d'anomalies au niveau de l'intima. L'analyse en microscope électronique pourrait être utile pour compléter notre travail en soulignant que l'analyse ultrastructurale d'aorte de rat streptozotocine a objectivé des altérations de la cellule endothéliale, l'adhésion de monocytes et l'augmentation du sous-endothélium (**Sun M et coll., 1998**). L'épaississement intima-média est décrit dans d'autres modèles de diabètes expérimentaux en particulier chez le rat Zucker (**Alderson N et coll., 2003**). Considéré comme un marqueur précoce d'athérosclérose, il est déjà observé au niveau carotidien chez des adolescents DT1 après 5 ans de diabète (**Jarvisalo M et coll., 2002**).

Les dépôts de glycosaminoglycanes observés à la coloration au bleu alcian sont également considérés comme des signes précurseurs d'athérome (**Renard C et coll., 2004**). Ils sont observés dans la paroi vasculaire du patient diabétique tout particulièrement au niveau de la média. Il existe d'ailleurs une corrélation entre ces dépôts en particulier d'acide

hyaluronique et la durée du diabète chez des patients DT1 (**Heickendorff L et coll., 1994**). Une augmentation des lésions d'athérosclérose est constatée chez des souris transgéniques qui surexpriment l'acide hyaluronique dans la média des gros vaisseaux (**Chai S et coll., 2005**), l'excès d'acide hyaluronique stimulerait les cellules musculaires lisses et le recrutement des monocytes.

Le remodelage de la matrice extracellulaire caractérisé par des phénomènes de collagénèse et d'élastolyse tels que nous avons pu le constater dans notre modèle est concordant avec les données de la littérature (**Chang K et coll., 2006 ; Forbes J et coll., 2004**). Ces anomalies sont aussi décrites dans le vieillissement vasculaire et semblent expliquer les modifications des propriétés mécaniques vasculaires telles que la rigidité artérielle.

L'immunomarquage de l'actine lisse est diminué au cours du diabète dans notre modèle. Ceci pourrait correspondre à une atrophie de la cellule musculaire lisse liée à l'hyperglycémie (**Meng J et coll., 1998**). Il est possible également d'évoquer une modification du phénotype de la cellule musculaire lisse qui se caractérise par une perte de ses capacités contractiles au profit de capacités de synthèse et de prolifération comme cela était décrit *in vitro* sur des cellules musculaires lisses issus de rats STZ (**Etienne P et coll., 1998**). Cependant, sur un modèle de souris KO apo E rendues diabétiques par injection de STZ, il a été rapporté une augmentation de l'immunomarquage de l'actine (**Forbes J et coll., 2004**). Outre les différences de modèles expérimentaux (souris KO apo E, 20 semaines de diabète versus souris C57Black, 4 semaines de diabète), ce résultat discordant peut résulter des limites des études immunohistologiques en particulier de leur caractère semi-quantitatif. Une analyse des coupes via un logiciel de traitement d'image fait partie de nos perspectives de travail. Par ailleurs, il est possible que l'hyperglycémie entraîne des phénomènes de glycation de l'actine qui altèrent la reconnaissance avec l'anticorps utilisé et donc diminue le marquage dans notre travail. Une analyse immunohistochimique des AGEs permettrait de vérifier cette hypothèse.

L'efficacité de l'AG dans les anomalies de vasorelaxation a déjà été décrite. Notre travail démontre que le traitement par AG prévient également et simultanément les anomalies histomorphologiques liées au diabète en particulier les lésions qui sont associées au stade précoce d'athérosclérose : épaisseur intima-média, dépôts de glycoaminoglycanes et le remodelage de la matrice extracellulaire. De nombreux travaux expérimentaux rendent compte de l'efficacité de l'AG dans les complications vasculaires liées au diabète en particulier sur l'hypertrophie mésentérique (**Rumble J et coll., 1997**), sur l'hypertrophie cardiaque (**Stadler K et coll., 2005**), sur la rigidité artérielle (**Chang B et coll., 2006**). Notre

travail montre que plus l'AG est administrée tôt et meilleure est l'efficacité. L'efficacité de l'AG procède par l'inhibition des AGEs en particulier au niveau du collagène limitant ainsi des pontages intermoléculaires (**Chang B et coll., 2006**). L'activité anti oxydante de l'AG pourrait également se montrer favorable sur le remodelage de la matrice extracellulaire (**Fiordaliso F et coll., 2005**). Enfin, il a été rapporté récemment que l'AG réduisait les lésions d'athérosclérose chez la souris KO apoE diabétique pendant 20 semaines avec sur l'aorte une diminution de l'accumulation des AGEs, du collagène et de l'expression de RAGE. Des résultats similaires sont obtenus avec des agents « casseurs de ponts » tels que ALT 711 (**Forbes J et coll., 2004**). L'ensemble de ces données associées à nos résultats permet de positionner l'aminoguanidine et peut être plus largement les molécules antiAGE comme des agents capables potentiellement d'inhiber les différents stades de développement de l'athérosclérose y compris les stades précoces dans la maladie diabétique.

Pour compléter le travail, l'analyse des dépôts des AGEs et l'expression de RAGE en immunohistologie sur notre modèle est indispensable. De plus, l'utilisation d'autres molécules anti AGE est envisagée en particulier comme nous l'avons vu des agents « casseurs de ponts » tels que ALT 711 et la benfothiamine. L'utilisation du RAGE soluble est également séduisante dans la mesure où le traitement par RAGE soluble prévient l'athérosclérose sur la souris KO apoE streptozotocine, aucune donnée sur les stades précoces d'athérosclérose n'est à ce jour rapportée.

Conclusion générale

L'âge avancé et le diabète sont des facteurs reconnus de survenue d'événements vasculaires. Le nombre de sujets âgés et la prévalence du diabète augmenteront considérablement dans les années à venir. La compréhension des mécanismes impliqués dans les anomalies artérielles liées à l'âge et au diabète permettra d'ouvrir de nouvelles thérapeutiques pour limiter la survenue des accidents vasculaires, responsables de dépendance, de perte d'autonomie avec des coûts économiques considérables.

Le travail que nous avons mené permet, dans un premier temps, d'établir un parallélisme entre les modifications morphologiques et les modifications fonctionnelles survenant dans deux modèles d'altérations artérielles, l'un lié à l'âge, l'autre au diabète. Dans un deuxième temps et pour chacun des modèles, une molécule susceptible de restaurer ou de prévenir les anomalies artérielles a été testée.

Les modèles étudiés se caractérisent par des altérations similaires tant sur le plan morphologique que fonctionnel. Ainsi nous parlons de vieillissement artériel lié à l'âge et de vieillissement artériel lié au diabète. On note une augmentation de l'épaisseur intima-média, une désorganisation et des ruptures des lames élastiques, des modifications de répartition de l'actine au sein des cellules musculaires lisses. Sur le plan fonctionnel, la relaxation endothélium-dépendante a été étudiée et s'altère avec l'avancée en âge des animaux et la survenue du diabète. C'est la rapidité d'apparition et d'évolution des lésions artérielles qui diffère dans ces deux modèles. Les lésions surviennent très tôt après l'induction du diabète, dès la quatrième semaine, alors qu'elles apparaissent et se développent plus lentement avec l'avancée en âge. C'est pourquoi le terme de vieillissement artériel accéléré est régulièrement mentionné pour qualifier le vieillissement artériel lié au diabète. La cinétique d'apparition des lésions artérielles et leur évolutivité est intéressante à établir afin de déterminer à quel moment un traitement doit être instauré pour prévenir l'apparition des lésions artérielles dans ces modèles.

Si les anomalies morphologiques et fonctionnelles sont bien décrites dans la littérature pour le vieillissement artériel lié à l'âge, c'est l'évolution avec l'avancée en âge et l'étude

concomittante de la fonction endothéliale dans un modèle murin qui fait l'originalité de ce travail. Pour ce qui est du diabète, les altérations morphologiques sont peu détaillées notamment dans un modèle murin et là encore, cette étude associée à l'étude fonctionnelle fait l'originalité du travail.

L'analyse de la littérature permet d'émettre une hypothèse principale commune quant à la survenue de la dysfonction endothéliale survenant au cours du vieillissement artériel lié à l'âge et au diabète, à savoir le stress oxydant. Par ailleurs, il est montré une augmentation des AGEs avec l'avancée en âge et une implication forte des AGEs dans la physiopathologie des complications du diabète. La relation AGEs-stress oxydant est établie.

Dans le modèle du vieillissement artériel lié au vieillissement, nous avons choisi d'étudier l'aspirine à faibles doses, en raison de l'efficacité de cette molécule dans la prévention primaire et secondaire des accidents vasculaires et de son action sur le stress oxydant. L'administration d'aspirine à faibles doses dans le modèle de vieillissement artériel diminue la survenue de certaines anomalies pariétales aortiques, notamment la répartition du contingent collagénique et prévient la survenue de la dysfonction endothéliale étudiée par la relaxation endothélium-dépendante chez des animaux d'âge moyen. Parallèlement, il est constaté une diminution significative d'un des marqueurs du stress oxydant aortique, le 8OHdG.

Dans le modèle de vieillissement artériel lié au diabète, l'aminoguanidine a été choisie étant la molécule de référence dans l'inhibition de la synthèse des AGEs. Dans ce modèle, l'administration d'aminoguanidine permet également la diminution de survenue des anomalies de la paroi aortique et la prévention de la la dysfonction endothéliale étudiée par la relaxation-endothélium-dépendante.

Ainsi, le premier modèle confirme le rôle déterminant du stress oxydant dans la genèse du vieillissement artériel lié à l'âge, le deuxième le rôle déterminant du système AGE-RAGE dans la physiopathologie des complications du diabète. La prévention de certaines anomalies artérielles induites par le vieillissement physiologique lié à l'âge ou accéléré lié au diabète serait donc possible notamment la dysfonction endothéliale mais cela nécessite l'instauration d'un traitement avant ou rapidement après l'apparition de la dysfonction endothéliale. Dans les 2 modèles étudiés, une instauration tardive du traitement alors que la dysfonction endothéliale est établie ne restaure pas cette dernière.

Nos travaux apportent des éléments nouveaux pour positionner la fonction endothéliale comme cible thérapeutique. Ils incitent dans les modèles étudiés à traiter précocément voire avant l'apparition de la dysfonction endothéliale. Stress oxydant et système AGE-RAGE sont intimement liés, sont impliqués dans la dysfonction endothéliale et sont donc des cibles

thérapeutiques privilégiées pour la prévention des maladies vasculaires. Les connaissances sur les AGEs et le stress oxydant se précisent, permettant sans doute de développer des agents plus spécifiques ou de mieux comprendre le mécanisme d'action de molécules déjà très utilisées telles que l'aspirine.

Références

Alderson NL, Chachich ME, Youssef NN, Beattie RJ, Nachtigal M, Thorpe SR, Baynes JW. The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits lipemia and development of renal and vascular disease in Zucker obese rats. *Kidney Int.* 2003;63:2123-33

Algotsson A, Nordberg A, Winblad B. Influence of age and gender on skin vessel reactivity to endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilators tested with iontophoresis and a laser Doppler perfusion imager. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 1995;50:M121-7

Angulo J, Rodriguez-Manas L, Peiro C, Neira M, Marin J, Sanchez-Ferrer CF. Impairment of nitric oxide-mediated relaxations in anaesthetized autoperfused streptozotocin-induced diabetic rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1998;358:529-37

Angulo J, Cuevas P, Fernandez A, Gabancho S, Allona A, Martin-Morales A, Moncada I, Videla S, Saenz de Tejada I. Diabetes impairs endothelium-dependent relaxation of human penile vascular tissues mediated by NO and EDHF. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;312:1202-8

Antiplatelet Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high-risk patients. *Br Med J.* 324:71-86, 2002

Appleton I, Tomlinson A, Willoughby DA. Induction of cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. *Adv Pharmacol.* 1996;35:27-78

Archer SL, Huang JMC, Hampl V, et al. Nitric oxide and GMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci.* 1994;91:7583-7587

Archibald V, Cotter MA, Keegan A, Cameron NE. Contraction and relaxation of aortas from diabetic rats: effects of chronic anti-oxidant and aminoguanidine treatments. *Naunyn Schmiedebergs. Arch Pharmacol.* 1996;353:584-91

Asai K, Kudej RK, Shen YT, Yang GP, Takagi G, Kudej AB, Geng YJ, Sato N, Nazareno JB, Vatner DE, Natividad F, Bishop SP, Vatner SF. Peripheral vascular endothelial dysfunction and apoptosis in old monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1493-9

Atkinson J, Tatchum-Talom R, Capdeville- Atkinson C. Reduction of endothelial function with age in mesenteric arterial bed of the normotensive rat. *Br J Pharmacol.* 1994;111:1184-1188

Awtry EH, Loscalzo J. Aspirin. *Circulation.* 2000;10:1206-18

Barton M, Cosentino F, Brandes RP, Moreau P, Shaw S, Lüscher TF. Anatomic heterogeneity of vascular aging: role of nitric oxide and endothelin. *Hypertension*. 1997;30:817-24

Bailey AJ, Paul RG, Knott L. Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mech Ageing Dev*. 1998;106:1-56

Baynes JW. The role of AGEs in aging: causation or correlation. *Exp Gerontol*. 2001;36:1527-1537

Becker BF, Heindl B, Kupatt C, Zahler S. Endothelial function and hemostasis. *Z Kardiol*. 2000;89:160-7

Berger JS, Roncaglioni MC, Avanzini F, Pangrazzi I, Tognoni G and Brown DL. Aspirin for the primary prevention of cardiovascular events in women and men: a sex-specific meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Med Assoc*. 2006; 295:306-313

Billiar TR. The delicate balance of nitric oxide and superoxide in liver pathology. *Gastroenterology*. 1995;108:603-605

Bogatcheva NV, Garcia JG, Verin AD. Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability. *Biochemistry*. 2002 ;67:75-84

Bohlen HG, Lash JM. Topical hyperglycemia rapidly suppresses EDRF mediated vasodilation of normal rat arterioles. *Am. J. Physiol*. 1993;265:219-225

Bohlen HG, Lash JM. Endothelial-dependent vasodilation is preserved in non-insulin-dependent Zucker fatty diabetic rats. *Am J Physiol*. 1995;268:2366-74

Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, et al. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*. 1994;368:850-853

Boulanger C, Luscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest*. 1990;85:587-590

Brown NJ & Roberts LJ. Histamine, bradykinin and their antagonists. In Goodman & Gillman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 2001;10th edn, ed. HARDMAN J & LIMBIRD L, 645–669. McGraw Hill, New York, NY, USA

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414:813-20

Bucala R, Tracey KJ and Cerami A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest* 1991;87: 432-438

Bucciarelli LG, Wendt T, Qu W, Lu Y, Lalla E, Rong LL, Goova MT, Moser B, Kislinger T, Lee DC, Kashyap Y, Stern DM, Schmidt AM. RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. *Circulation*. 2002;106: 2827-35

Busse R, Mulsch A, Fleming I. & Hecker M. Mechanisms of nitric oxide release from the vascular endothelium. *Circulation*. 1993;87:18–25

Cameron NE, Cotter MA. Impaired contraction and relaxation in aorta from streptozotocin-diabetic rats: role of polyol pathway. *Diabetologia*. 1992;35:1011-9

Campbell WB, Harder DR. Endothelium-derived hyperpolarizing factors and vascular cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in the regulation of tone. *Circ Res*. 1999;84:384-8

Campbell CL, Smyth S, Montalescot G and Steinhubl SR. Aspirin dose for the prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *J Am Med Assoc*. 2007;297:2018-2024

Celermajer DS, Sorensen KE, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Deanfield JE. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J Am Coll Cardiol*. 1994;24:471-6

Cernadas MR, Sánchez de Miguel L, García-Durán M, González-Fernández F, Millás I, Montón M, Rodrigo J, Rico L, Fernández P, de Frutos T, Rodríguez-Feo JA, Guerra J, Caramelo C, Casado S, López-Farré. Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats. *Circ Res*. 1998;83:279-86

Chai S, Chai Q, Danielsen CC, Hjorth P, Nyengaard JR, Ledet T, Yamaguchi Y, Rasmussen LM, Wogensen L. Overexpression of hyaluronan in the tunica media promotes the development of atherosclerosis. *Circ Res*. 2005;96:583-91

Chan NN, Vallance P, Colhoun HM. Endothelium-dependent and -independent vascular dysfunction in type 1 diabetes: role of conventional risk factors, sex, and glycemic control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:1048-54

Chang KC, Hsu KL, Tseng CD, Lin YD, Cho YL, Tseng YZ. Aminoguanidine prevents arterial stiffening and cardiac hypertrophy in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Br J Pharmacol*. 2006;147:944-50

Chauhan A, More RS, Mullins PA, Taylor G, Petch C, Schofield PM. Aging-associated endothelial dysfunction in humans is reversed by L-arginine. *J Am Coll Cardiol*. 1996;28:1796-804

Chinellato A, Pandolfo L, Ragazzi E, Zambonin MR, Froidi G, De Biasi M, Caparrotta L, Fassina G. Effect of age on rabbit aortic responses to relaxant endothelium-dependent and endothelium-independent agents. *Blood Vessels*. 1991;28:358-65

Cipollone F, Iezzi A, Fazio M, Zucchelli M, Pini B, Cuccurullo C, De Cesare D, De Blasis G, Muraro R, Bei R, Chiarelli F, Schmidt AM, Cuccurullo F, Mezzetti A. The receptor RAGE as a progression factor amplifying arachidonate-dependent inflammatory and proteolytic response in human atherosclerotic plaques: role of glycemic control. *Circulation*. 2003;108:1070-7

Chung HY, Kim HJ, Kim KW, Choi JS, Yu BP. Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of caloric restriction. *Microsc. Res. Tech.* 2002;59:264-272

Clarkson P, Celermajer DS, Donald AE, Sampson M, Sorensen KE, Adams M, Yue DK, Betteridge DJ, Deanfield JE. Impaired vascular reactivity in insulin-dependent diabetes mellitus is related to disease duration and low density lipoprotein cholesterol levels. *J Am Coll Cardiol.* 1996;28:573-9

Cohen RA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic cGMP. *Circulation.* 1995;92:3337-3349

Colden-Stanfield M, Schilling WP, Ritchie AK, Eskin SG, Navarro LT, Kunze DL. Bradykinin-induced increases in cytosolic calcium and ionic currents in cultured bovine aortic endothelial cells *Circ Res.* 1987;61:632-40

Collaborative Group of the Primary Prevention Project. Low-dose aspirin and vitamin E in people at cardiovascular risk: a randomised trial in general practice. *Lancet.* 2001;357:89-95

Cosson E, Pham I, Valensi P, Paries J, Attali JR, Nitenberg A. Impaired coronary endothelium-dependent vasodilation is associated with microalbuminuria in patients with type 2 diabetes and angiographically normal coronary arteries. *Diabetes Care.* 2006;29:107-12

Crijns FR, Struijker Boudier HA, Wolfenbittel BH. Arteriolar reactivity in conscious diabetic rats: influence of aminoguanidine treatment. *Diabetes.* 1998;47:918-23

Cyrus T, Sung S, Zhao L, Funk CD, Tang S and Pratico D. Effect of low-dose aspirin on vascular inflammation, plaque stability, and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation.* 2002;106:1282-1287

Cyrus T, Yao Y, Tung LX and Pratico D. Stabilization of advanced atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice by aspirin. *Atherosclerosis.* 2006;184:8-14

Damme B, Darmerb D and Pankowa D. Induction of hepatic cytochrome P450 2E1 in rats by acetylsalicylic acid or sodium salicylate. *Toxicology* 1996;106: 99-103

Danthuluri NR, Cybulsky MI, Brock TA. ACh-induced calcium transients in primary cultures of rabbit aortic endothelial cells. *Am J Physiol.* 1988;255:549-53

Davidge ST, Hubel CA, McLaughlin MK. Impairment of vascular function is associated with an age-related increase of lipid peroxidation in rats. *Am J Physiol.* 1996;271:625-31

Deng S, Deng PY, Jiang JL, Ye F, Yu J, Yang TL, Deng HD and Li YJ. Aspirin protected against endothelial damage induced by LDL: role of endogenous NO synthase inhibitors in rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2004;25:1633-1639

DeSouza CA, Shapiro LF, Clevenger CM, Dinunno FA, Monahan KD, Tanaka H, Seals DR. Regular aerobic exercise prevents and restores age-related declines in endothelium-dependent vasodilation in healthy men. *Circulation.* 2000;102:1351-7

De Zwart LL, Meeman J, Commandeur JN and Vermeulen NP. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biol & Med.* 1999;26: 202–226

De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol.* 2000;130:963-74

Diederich D, Skopec J, Diederich A, Dai FX. Endothelial dysfunction in mesenteric resistance arteries of diabetic rats: role of free radicals. *Am J Physiol.* 1994; 266:1153-61

Dragomir E, Manduteanu I, Voinea M, Costache G, Manea A and Simionescu M. Aspirin rectifies calcium homeostasis, decreases reactive oxygen species, and increases NO production in high glucose-exposed human endothelial cells. *J Diabetic Complications.* 2004;18: 289-299

Drexler H, Zeiher AM, Meinzer K, Just H. Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine. *Lancet.* 1991;33:1546-50

Eisele G, Schwedhelm E, Schieffer B, Tsikas D and Böger RH. Acetylsalicylic acid inhibits monocyte adhesion to endothelial cells by an antioxydative mechanism. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004; 43:514-521

El Midaoui A, Wu R, De Champlain J. Prevention of hypertension , hyperglycemia and vascular oxidative stress by aspirin treatment in chronically glucose-fed rats. *Journal of hypertension.* 2002;20:1407-1412

Enderle MD, Benda N, Schmuelling RM, Haering HU, Pfohl M. Preserved endothelial function in IDDM patients, but not in NIDDM patients, compared with healthy subjects. *Diabetes Care.* 1998; 21:271-7

Endo K, Abiru T, Machida H, Kasuya Y, Kamata K. Endothelium-derived hyperpolarizing factor does not contribute to the decrease in endothelium-dependent relaxation in the aorta of streptozotocin-induced diabetic rats. *Gen Pharmacol.* 1995;26:149-53

Etienne P, Pares-Herbute N, Mani-Ponset L, Gabrion J, Rabesandratana H, Herbute S, Monnier L. Phenotype modulation in primary cultures of aortic smooth muscle cells from streptozotocin-diabetic rats. *Differentiation.* 1998;63:225-36

Facchiano F, Lentini A, Fogliano V, Mancarella S, Rossi C, Facchiano A, Capogrossi MC. Sugar-induced modification of fibroblast growth factor 2 reduces its angiogenic activity in vivo. *Am J Pathol.* 2002;161:531-41

Félétou M, Vanhoutte PM. EDHF: new therapeutic targets? *Pharmacological Research.* 2004;49:565–580

Fénina A, Geffroy Y, Minc C, Renaud Th, Sarlon E, Sermet C. Les dépenses de prévention et les dépenses de soins par pathologie en France. *Bulletin d'Information en Economie de la Santé.* 2006;111

Fiordaliso F, Cuccovillo I, Bianchi R, Bai A, Doni M, Salio M, De Angelis N, Ghezzi P, Latini R, Masson S. Cardiovascular oxidative stress is reduced by an ACE inhibitor in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Life Sci.* 2006;79:121-9

Fishman AP. Endothelium: a distributed organ of diverse capabilities. *Ann N Y Acad Sci.* 1982;401:1-8

Fitzgerald SM, Kemp-Harper BK, Tare M, Parkington HC. Role of endothelium-derived hyperpolarizing factor in endothelial dysfunction during diabetes. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2005;32:482-7

Forbes JM, Yee LT, Thallas V, Lassila M, Candido R, Jandeleit-Dahm KA, Thomas MC, Burns WC, Deemer EK, Thorpe SR, Cooper ME, Allen TJ. Advanced glycation end product interventions reduce diabetes-accelerated atherosclerosis. *Diabetes.* 2004;53:1813-23

Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension.* 1994;23:1121-31

Forstermann U, Kleinert H. Nitric oxide synthase : expression and expressional control of the three isoforms. *Arch of Pharmacol.* 1995;352:351-364

Foucaud L, Bennisroune A, Klestadt D, Laval-Gilly P, Falla J. Oxidative stress induction by short time exposure to ozone on THP-1 cells. *Toxicol In Vitro.* 2006;20:101-8

Fukao M, Hattori Y, Kanno M, Sakuma I, Kitabatake A. Alterations in endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries from streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol.* 1997;121:1383-91

Fulton D, McGiff JC, Quilley J. Role of phospholipase C and phospholipase A2 in the nitric oxide-independent vasodilator effect of bradykinin in the rat perfused heart. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996;278:518-26

Furchgott RF, Zawadski JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;28:373-376

Garçon G, Zerimech F, Hannotiaux M, Gosset P, Martin A, Marez T and Shirali P. Antioxidant defense disruption by polycyclic aromatic hydrocarbons coated onto Fe₂O₃ particles in human lung cells (A549). *Toxicology* 2001a;166:129-137,

Garçon G, Gosset P, Garry S, Marez T, Hannotiaux MH and Shirali P. Pulmonary induction of proinflammatory mediators following the rat exposure to benzo(a)pyrene coated onto Fe₂O₃ particles. *Toxicol Lett* 2001b;121:107-117,

Gazis A, White DJ, Page SR, Cockcroft JR. Effect of oral vitamin E (alpha-tocopherol) supplementation on vascular endothelial function in Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 1999;16:304-11

Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care.* 1996;19:257-67

Gokce N, Keaney JF Jr, Hunter LM, Watkins MT, Menzoian JO, Vita JA. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation.* 2002;105:1567-72

Goto K, Hama H, Kasuya Y. Molecular pharmacology and pathophysiological significance of endothelin. *Jpn J Pharmacol.* 1996;72:261-90

Goto K, Fujii K, Onaka U, Abe I and Fujishima M. Angiotensin-converting enzyme inhibitor prevents age-related endothelial dysfunction. *Hypertension.* 2000;36:581-587

Grosser N and Schroder H. Aspirin protects endothelial cells from oxidant damage via the nitric oxide-cGMP pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1345-1351

Hajdu MA, McElmurry RT, Heistad DD et al. Effects of aging on cerebral vascular responses to serotonin in rats. *Am J Physiol* 1993;264:2136-40

Haidet GC, Wennberg PW, Rector TS. Aging and vasoreactivity : in vivo responses in the beagle hindlimb. *Am J Physiol.* 1995;268:92-9

Halcox JP, Schenke WH, Zalos G, Mincemoyer R, Prasad A, Waclawiw MA, Nour KR, Quyyumi AA. Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation.* 2002;106:653-8

Halcox JP, Donald AE, Ellins E, Witte DR, Shipley MJ, Brunner EJ, Marmot MG, Deanfield JE. Endothelial function predicts progression of carotid intima-media thickness. *Circulation.* 2009;119:1005-12

Hansson L, Zanchetti A, Carruthers SG, Dahlöf B, Elmfeldt D, Julius S, Ménard J, Rahn KH, Wedel H, Westerling S. Effects of intensive blood-pressure lowering and low-dose aspirin in patients with hypertension: principal results of the Hypertension Optimal Treatment (HOT) randomised trial. HOT Study Group. *Lancet.* 1998;351:1755-62

Hattori Y, Kawasaki H, Abe K, Kanno M. Superoxide dismutase recovers altered endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. *Am J Physiol.* 1991;261:H1086-94

Haut Comité de Santé Publique. Actualités et dossier en Santé publique. 2004

Heickendorff L, Ledet T, Rasmussen LM. Glycosaminoglycans in the human aorta in diabetes mellitus: a study of tunica media from areas with and without atherosclerotic plaque. *Diabetologia.* 1994;37:286-92

Heitzer T, Just H, Münzel T. Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation.* 1996;94:6-9

Heygate KM, Lawrence IG, Bennett MA, Thurston H. Impaired endothelium-dependent relaxation in isolated resistance arteries of spontaneously diabetic rats. *Br J Pharmacol.* 1995;116:3251-9.

Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Kimura M, Noma K, Hara K, Jitsuiki D, Goto C, Oshima T, Chayama K, Yoshizumi M. Tetrahydrobiopterin improves aging-related impairment of endothelium-dependent vasodilation through increase in nitric oxide production. *Atherosclerosis.* 2006;186:390-5

Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RA, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U, Munzel T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res.* 2001;88:E14-22.

Hongo K, Nakagomi T, Kassell NF, Sasaki T, Lehman M, Vollmer DG, Tsukahara T, Ogawa H, Torner J. Effects of aging and hypertension on endothelium-dependent vascular relaxation in rat carotid artery. *Stroke.* 1988;19:892-7

Husain S, Andrews NP, Mulcahy D, Panza JA, Quyyumi AA. Aspirin improves endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 1998;97:716-20

Huxley R, Barzi F, Woodward M. Excess risk of fatal coronary heart disease associated with diabetes in men and women: meta-analysis of 37 prospective cohort studies. *Br.Med J.* 2006;332:73-8.

Hwang ES and Kimb GH. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. *Toxicology.* 2007;229:1-10

Insee Première. 2006;1089

Jarvisalo MJ, Putto-Laurila A, Jartti L, Lehtimäki T, Solakivi T, Ronnema T, Raitakari OT. Carotid artery intima-media thickness in children with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2002;51:493-8

Jensen-Urstad K, Johansson J. Gender difference in age-related changes in vascular function. *J Intern Med.* 2001;250:29-36

Jung KJ, Kim JY, Zou Y, Kim YJ, Yu BP and Chung HY. Effect of short-term, low-dose aspirin supplementation on the activation of pro-inflammatory NF- κ B in aged rats. *Mech Ageing Dev.* 2006;127:223-230

Kalgutkar AS, Kozak KR, Crews BC, Hochgesang GP Jr, Marnett LJ. Covalent modification of cyclooxygenase-2 (COX-2) by 2-acetoxyphenyl alkyl sulfides, a new class of selective COX-2 inactivators. *J Med Chem.* 1998;41:4800-18

Kalkman EA, van Suylen RJ, van Dijk JP, Saxena PR and Schoemaker RG. Chronic aspirin treatment affects collagen deposition in non-infarcted myocardium during remodeling after coronary artery ligation in the rat. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27:2483-2494

Kato T, Iwama Y, Okumura K, Hashimoto H, Ito T, Satake T. Prostaglandin H₂ may be the endothelium-derived contracting factor released by acetylcholine in the aorta of the rat. *Hypertension*. 1990;15:475-8

Keegan A, Walbank H, Cotter MA, Cameron NE. Chronic vitamin E treatment prevents defective endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. *Diabetologia*. 1995;38:1475-8

Khan F, Cohen RA, Ruderman NB, Chipkin SR, Coffman JD. Vasodilator responses in the forearm skin of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Vasc Med*. 1996;1:187-93

Khan F, Cohen RA, Ruderman NB, Chipkin SR, Coffman JD. Vasodilator responses in the forearm skin of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Vasc Med*. 1996;1:187-93

Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation*. 2004;109:27-33

Kim HJ, Kim KW, Yu BP, Chung HY. The effect of age on cyclooxygenase-2 gene expression: NF-kappaB activation and IkappaBalpha degradation. *Free Radic. Biol. Med*. 2000;28:683-692

Koga T, Takata Y, Kobayashi K, Takishita S, Yamashita Y and Fujishima M. Ageing suppresses endothelium-dependent relaxation and generates contraction mediated by the muscarinic receptors in vascular smooth muscle of normotensive Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 1988;(Suppl) 6: S243-S245

Koltai MZ, Hadhazy P, Posa I, Kocsis E, Winkler G, Rosen P, Pogatsa G. Characteristics of coronary endothelial dysfunction in experimental diabetes. *Cardiovasc Res*. 1997;34:157-63

Küng CF, Lüscher TF. Different mechanisms of endothelial dysfunction with aging and hypertension in rat aorta. *Hypertension*. 1995;25:194-200

Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, Pandian NG, Rand WM, Udelson JE, Karas RH. Peripheral vascular endothelial function testing as a noninvasive indicator of coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:1843-9

Kuvin JT, Karas RH. Clinical utility of endothelial function testing: ready for prime time? *Circulation*. 2003;107:3243-7

Lakatta EG. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease Enterprises: Part III: Cellular and Molecular Clues to Heart and Arterial Aging. *Circulation*. 2003;107:490-497

Lambert J, Aarsen M, Donker AJ, Stehouwer CD. Endothelium-dependent and -independent vasodilation of large arteries in normoalbuminuric insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:705-11

Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation*. 2004;109:27-33

Lefer DJ, Scalia R, Campbell B, Nossuli T, Hayward R, Salamon M, Grayson J, Lefer AM. Peroxynitrite inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against ischemia-reperfusion injury in rats. *J Clin Invest*. 1997;99:684-91

Lekakis J, Papamichael C, Anastasiou H, Alevizaki M, Desses N, Souvatzoglou A, Stamatelopoulos S, Koutras DA. Endothelial dysfunction of conduit arteries in insulin-dependent diabetes mellitus without microalbuminuria. *Cardiovasc Res*. 1997;34:164-8

Lerman A, Burnett JC Jr, Higano ST, McKinley LJ, Holmes DR Jr. Long-term L-arginine supplementation improves small-vessel coronary endothelial function in humans. *Circulation*. 1998;97:2123-8

Li SY, Du M, Dolence EK, Fang CX et al. Aging induces cardiac diastolic dysfunction, oxidative stress, accumulation of advanced glycation endproducts and protein modification. *Aging Cell*. 2005;4:57-64

Li Z, Froehlich J, Galis ZS, et al. Increased expression of matrix metalloproteinase-2 in the thickened intima of aged rats. *Hypertension*. 1999;33:116-123

Lin L, Nasjletti A. Prostanoid-mediated vascular contraction in normotensive and hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*. 1992;220:49-53

Lindsay RM, Peet RS, Wilkie GS, Rossiter SP, Smith W, Baird JD, Williams BC. In vivo and in vitro evidence of altered nitric oxide metabolism in the spontaneously diabetic, insulin-dependent BB/Edinburgh rat. *Br J Pharmacol*. 1997;120:1-6.

Loeppen S, Koehle C, Buchmann A and Schwarz M. A β -catenin-dependent pathway regulates expression of cytochrome P450 isoforms in mouse liver tumors. *Carcinogenesis*. 2005;26:239-248

Loft S, Deng XS, Tuo J, Wellejus A, Sørensen M and Poulsen HE. Experimental study of oxidative DNA damage. *Free Radical Res*. 1998;29:525-539

Loll PJ, Sharkey CT, O'Connor SJ, Dooley CM, O'Brien E, Devocelle M, Nolan KB, Selinsky BS, Fitzgerald DJ. O-acetylsalicylhydroxamic acid, a novel acetylating inhibitor of prostaglandin H₂ synthase: structural and functional characterization of enzyme-inhibitor interactions. *Mol Pharmacol*. 2001;60:1407-13

Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1986;315:1046-51

Lyons CR, Orloff GJ, Cunningham JM. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Biol Chem*. 1992;267:6370-6374

MacAllister RJ, Calver AL, Collier J, Edwards CM, Herreros B, Nussey SS, Vallance P. Vascular and hormonal responses to arginine: provision of substrate for nitric oxide or non-specific effect? *Clin Sci (Lond)*. 1995;89:183-90

Magen E, Viskoper JR, Mishal J, Priluk R, London D and Yosefy C. Effects of low-dose aspirin on blood pressure and endothelial function of treated hypertensive hypercholesterolaemic subjects. *J Hum Hypertens*. 2005;19: 667-673

Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*. 2000;21:361-370

Matz RL, Andriantsitohaina R. Age-related endothelial dysfunction : potential implications for pharmacotherapy. *Drugs Aging*. 2003;20:527-50

Matz RL, Schott C, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Age-related endothelial dysfunction with respect to nitric oxide, endothelium-derived hyperpolarizing factor and cyclooxygenase products. *Physiol Res*. 2000;49:11-8

Matz RL, de Sotomayor MA, Schott C, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Vascular bed heterogeneity in age-related endothelial dysfunction with respect to NO and eicosanoids. *Br J Pharmacol*. 2000;131:303-11

May JM. How does acid ascorbic prevent endothelial dysfunction ? *Free Radic Biol Med*. 2000;28:1421-9

Mayhan WG, Faraci FM, Baumbach GL et al. Effects of aging on responses of cerebral arterioles. *Am J Physiol*. 1990;258:1138-43

Mayhan WG, Simmons LK, Sharpe GM. Mechanism of impaired responses of cerebral arterioles during diabetes mellitus. *Am J Physiol*. 1991;260:319-26

McNally PG, Watt PA, Rimmer T, Burden AC, Hearnshaw JR, Thurston H. Impaired contraction and endothelium-dependent relaxation in isolated resistance vessels from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Sci (Lond)*. 1994;87:31-6

The Medical Research Council's General Practice Research Framework Thrombosis prevention trial: randomised trial of low-intensity oral anticoagulation with warfarin and low-dose aspirin in the primary prevention of ischaemic heart disease in men at increased risk. *Lancet*. 1998;351:233-41

Meng J, Sakata N, Takebayashi S, Asano T, Futata T, Nagai R, Ikeda K, Horiuchi S, Myint T, Taniguchi N. Glycooxidation in aortic collagen from STZ-induced diabetic rats and its relevance to vascular damage. *Atherosclerosis*. 1998;136:355-65

Michel JB, Heudes D, Michel O, et al. Effect of chronic ANG I-converting enzyme inhibition on aging processes: II: large arteries. *Am J Physiol*. 1994;267:R124-R135

Minshall RD, Tiruppathi C, Vogel SM, Malik AB. Vesicle formation and trafficking in endothelial cells and regulation of endothelial barrier function. *Histochem Cell Biol*. 2002;117:105-12

Mitchell JA, Warner TD. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br J Pharmacol.* 1999;128:1121-32

Modena MG, Bonetti L, Coppi F, Bursi F, Rossi R. Prognostic role of reversible endothelial dysfunction in hypertensive postmenopausal women. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40:505-10

Møller P and Wallin H. Adduct formation, mutagenesis and nucleotide excision repair of DNA damage produced by reactive oxygen species and lipid peroxidation products. *Mutat Res.* 1998;410:271-290

Molnar J, Yu S, Mzhavia N, Pau C, Chereshev I, Dansky HM Diabetes induces endothelial dysfunction but does not increase neointimal formation in high-fat diet fed C57BL/6J mice. *Circ Res.*2005;96:1178-84.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43:109-42

Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanism and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J.* 1995;9:1319-1330

Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂, and prostacyclin. *Pharmacol Rev.* 1978;30:293-331

Moritoki H, Hosoki E, Ishida Y. Age-related decrease in endothelium-dependent dilator response to histamine in rat mesenteric artery. *Eur J Pharmacol.* 1986;126:61-7

Morrish NJ, Stevens LK, Head J, Fuller JH, Jarrett RJ, Keen H. A prospective study of mortality among middle-aged diabetic patients (the London Cohort of the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetics) I: Causes and death rates. *Diabetologia.* 1990;33:538-541

Murray C.J.L., and Lopez A.D. Alternative projections of mortality and disability by cause, 1990-2020: *Global burden of disease study.* *Lancet.* 1997;349:1498-1504

Narayanan S. Aldose reductase and its inhibition in the control of diabetic complications. *Ann Clin Lab Sci.* 1993;23:148-58

Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev.* 1999;79:1193-226

Nitenberg A, Valensi P, Sachs R, Dali M, Aptecar E, Attali JR. Impairment of coronary vascular reserve and ACh-induced coronary vasodilation in diabetic patients with angiographically normal coronary arteries and normal left ventricular systolic function. *Diabetes.* 1993;42:1017-25

Nitenberg A, Valensi P, Sachs R, Cosson E, Attali JR, Antony I. Prognostic value of epicardial coronary artery constriction to the cold pressor test in type 2 diabetic patients with angiographically normal coronary arteries and no other major coronary risk factors. *Diabetes Care.* 2004;27:208-15

Ogawa K, Imai M, Ogawa T, Tsukamoto Y, Sasaki F. Caveolar and intercellular channels provide major transport pathways of macromolecules across vascular endothelial cells. *Anat Rec.* 2001;264:32-42

Oates PJ. Aldose reductase, still a compelling target for diabetic neuropathy. *Curr Drug Targets.* 2008;9:14-36

Otsuka Long-Evans Tokushima. Fatty rat, a model of spontaneous NIDDM. *Diabetes.* 1998;47:82-6

Ozyazgan S, Unlucerci Y, Bekpinar S, Akkan AG. Impaired relaxation in aorta from streptozotocin-diabetic rats: effect of aminoguanidine (AMNG) treatment. *Int J Exp Diabetes Res.* 2000;1:145-53

Pacher P, Mabley JG, Soriano FG, Liaudet L, Komjati K, Szabo C. Endothelial dysfunction in aging animals: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Br J Pharmacol.* 2002;135:1347-50

Pacher P, Szabo C. Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation in the pathogenesis of diabetic complications: endothelial dysfunction, as a common underlying theme. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7:1568-80

Pannirselvam M, Verma S, Anderson TJ, Triggle CR. Cellular basis of endothelial dysfunction in small mesenteric arteries from spontaneously diabetic (*db/db*–/–) mice: Role of decreased tetrahydrobiopterin bioavailability. *Br J Pharmacol.* 2002;136:255-263

Papaioannou GI, Seip RL, Grey NJ, Katten D, Taylor A, Inzucchi SE, Young LH, Chyun DA, Davey JA, Wackers FJ, Iskandrian AE, Ratner RE, Robinson EC, Carolan S, Engel S, Heller GV. Brachial artery reactivity in asymptomatic patients with type 2 diabetes mellitus and microalbuminuria (from the Detection of Ischemia in Asymptomatic Diabetics-brachial artery reactivity study). *Am J Cardiol.* 2004;94:294-9

Park L, Raman KG, Lee KJ, Yan L, Ferran LJ, Chow WS, Stern D, Schmidt AM. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by soluble receptor for AGE (sRAGE). *Nat Med.* 1998;4:1025-1031

Patrono C, Collier B, FitzGerald GA, Hirsh J and Roth G. Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest.* 2004;126:234S-264S

Patrono C, Garcia Rodriguez LA, Landolfi R and Baigent C. Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *N Engl J Med.* 2005;353:2373-2383.

Pearson JD. Endothelial cell function and thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol.* 1999;12:329-41

Pelligrino DA, Koenig HM, Wang Q, Albrecht RF. Protein kinase C suppresses receptor-mediated pial arteriolar relaxation in the diabetic rat. *Neuroreport.* 1994;5:417-20

Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroroberto P, Verdecchia P, Schillaci G. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation*. 2001;104:191-196

Peto R, Gray R, Collins R, Wheatley K, Hennekens C, Jamrozik K, Warlow C, Hafner B, Thompson E, Norton S, et al. Randomised trial of prophylactic daily aspirin in British male doctors. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1988;296:313-6

Pieper GM, Peltier BA. Amelioration by L-arginine of a dysfunctional arginine/nitric oxide pathway in diabetic endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995;25:397-403

Pieper GM, Moore-Hilton G, Roza AM. Evaluation of the mechanism of endothelial dysfunction in the genetically-diabetic BB rat. *Life Sci*. 1996;58:147-52

Pieper GM, Langenstroer P, Siebeneich W. Diabetic-induced endothelial dysfunction in rat aorta: role of hydroxyl radicals. *Cardiovasc Res*. 1997;34:145-56

Pieper GM, Adams MB, Roza AM. Pancreatic transplantation reverses endothelial dysfunction in experimental diabetes mellitus. *Surgery*. 1998;123:89-95

Pieper GM. Enhanced, unaltered and impaired nitric oxide-mediated endothelium-dependent relaxation in experimental diabetes mellitus: importance of disease duration. *Diabetologia*. 1999;42:204-13

Podhaisky HP, Abate A, Polte T, Oberle S, Schroder H. Aspirin protects endothelial cells from oxidative-possible synergism with vitamin E. *FEBS Letter*. 1997;417:349-351

Preissner KT, Nawroth PP, Kanse SM. Vascular protease receptors: integrating haemostasis and endothelial cell functions. *J Pathol*. 2000;190:360-72

Preli RB, Klein KP, Herrington DM. Vascular effects of dietary L-arginine supplementation. *Atherosclerosis*. 2002;162:1-15

Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. The endothelial surface layer. *Pflugers Arch*. 2000;440:653-66

Rahmani MA, Mangroo T, Neves M, Bienaime M, Wiggins S, Williams J et al. Effect of aspirin on the contractility of aortic rings in vitro from spontaneously hypertensive rats. *Artery* 1993;20:135-146

Renard CB, Kramer F, Johansson F, Lamharzi N, Tannock LR, von Herrath MG, Chait A, Bornfeldt KE. Diabetes and diabetes-associated lipid abnormalities have distinct effects on initiation and progression of atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 2004;114:659-68

Richter C. Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing. *Int J Biochem Cell Biol*. 1995;27:647-653

Rodriguez-Martinez MA, Alonso MJ, Redondo J, Salaices M and Marin J. Role of lipid peroxidation and the glutathione-dependent antioxidant system in the impairment of endothelium-dependent relaxations with age. *Br J Pharmacol*. 1998;123:113-121

Rodriguez-Manas L, Angulo J, Vallejo S, Peiro C, Sanchez-Ferrer A, Cercas E, Lopez-Doriga P, Sanchez-Ferrer CF. Early and intermediate Amadori glycosylation adducts, oxidative stress, and endothelial dysfunction in the streptozotocin-induced diabetic rats vasculature. *Diabetologia*. 2003;46:556-66

Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-26

Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins:molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev*. 1994;46:325-415

Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol*. 1986;250:H822-7

Rumble JR, Cooper ME, Soulis T, Cox A, Wu L, Youssef S, Jasik M, Jerums G, Gilbert RE. Vascular hypertrophy in experimental diabetes. Role of advanced glycation end products. *J Clin Invest*. 1997;99:1016-27

Saenz de Tejada I, Goldstein I, Azadzo K, Krane RJ, Cohen RA. Impaired neurogenic and endothelium-mediated relaxation of penile smooth muscle from diabetic men with impotence. *N Engl J Med*. 1989;320:1025-30

Sakamoto S, Minami K, Niwa Y, Ohnaka M, Nakaya Y, Mizuno A, Kuwajima M, Shima K. Effect of exercise training and food restriction on endothelium-dependent relaxation in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat, a model of spontaneous NIDDM. *Diabetes*. 1998;47:82-6

Sanmuganathan PS, Ghahramani P, Jackson PR, Wallis EJ, Ramsay LE. Aspirin for primary prevention of coronary heart disease: safety and absolute benefit related to coronary risk derived from meta-analysis of randomised trials. [*Heart*](#). 2001;85:265-71

Sarabi M, Millgård J, Lind L. Effects of age, gender and metabolic factors on endothelium-dependent vasodilation: a population-based study. *J Intern Med*. 1999;246:265-74

Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*. 2000;101:1899-1906

Schmidt AM, Hasu M, Popov D, Zhang JH, Chen J, Yan SD, Brett J, Cao R, Kuwabara K, Costache G, et al. Receptor for advanced glycation end products (AGEs) has a central role in vessel wall interactions and gene activation in response to circulating AGE proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:8807-11

Schmidt AM, Horio O, Li Jf, Grandall J, Zhang J, Cao R, Yan Sd, Brett J, Stern D. Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest*. 1995;96:1395-403.

Scotland RS, Morales-Ruiz M, Chen Y, Yu J, Rudic RD, Fulton D, Gratton JP, Sessa WC. Functional reconstitution of endothelial nitric oxide synthase reveals the importance of serine 1179 in endothelium-dependent vasomotion. *Circ Res.* 2002;90:904-10

Seibold SA, Ball T, Hsi LC, Mills DA, Abeysinghe RD, Micielli R, Rieke CJ, Cukier RI, Smith WL. Histidine 386 and its role in cyclooxygenase and peroxidase catalysis by prostaglandin-endoperoxide H synthases. *J Biol Chem.* 2003;278:46163-70

Shestakova MV, Jarek-Martynowa IR, Ivanishina NS, Kuharenko SS, Yadrihinskaya MN, Aleksandrov AA, Dedov II. Role of endothelial dysfunction in the development of cardiorenal syndrome in patients with type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2005;68:65-72

Shimizu K, Muramatsu M, Kakegawa Y, Asano H, Toki Y, Miyazaki Y, Okumura K, Hashimoto H, Ito T. Role of prostaglandin H₂ as an endothelium-derived contracting factor in diabetic state. *Diabetes.* 1993;42:1246-52

Shimizu I, Toda N. Alterations with age of the response to vasodilator agents in isolated mesenteric arteries of the beagles. *Br J Pharmacol.* 1986;89:769-78

Shimokawa H. Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J of Mol Coll Cardiol.* 1999;31,23-37

Shin WS, Sasaki T, Kato M, Hara K, Seko A, Yang WD, Shimamoto N, Sugimoto T, Toyooka T. Autocrine and paracrine effects of endothelium-derived relaxing factor on intracellular Ca²⁺ of endothelial cells and vascular smooth muscle cells. Identification by two-dimensional image analysis in coculture. *J Biol Chem.* 1992;267:20377-82

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

Simons LA, von Konigsmark M, Simons J, Stocker R, Celermajer DS. Vitamin E ingestion does not improve arterial endothelial dysfunction in older adults. *Atherosclerosis.* 1999;143:193-9

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985 Oct;150(1):76-85. Erratum in: *Anal Biochem* 1987;163:279

Smits P, Kapma JA, Jacobs MC, Lutterman J, Thien T. Endothelium-dependent vascular relaxation in patients with type I diabetes. *Diabetes.* 1993;42:148-53

Soriano FG, Virag L, Jagtap P, Szabo E, Mabley JG, Liaudet L, Marton A, Hoyt DG, Murthy KG, Salzman AL, Southan GJ, Szabo C. Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Nat Med.* 2001a;7:108-13

Soriano FG, Pacher P, Mabley J, Liaudet L, Szabo C. Rapid reversal of the diabetic endothelial dysfunction by pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase. *Circ Res.* 2001b;89:684-91

Spinetti G, Wang M, Monticone R, et al. Rat aortic MCP-1 and its receptor CCR2 increase with age and alter vascular smooth muscle cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1397-402

Stadler K, Jenei V, Somogyi A, Jakus J. Beneficial effects of aminoguanidine on the cardiovascular system of diabetic rats. *Diabetes Metab Res Rev.* 2005;21:189-96

Stamler JS. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell.* 1994;78:931-6

Steering Committee of the Physicians' Health Study Research Group. Final report on the aspirin component of the ongoing Physicians' Health Study. *N Engl J Med.* 1989;321:129-35

Stoclet JC, Muller B, György K, Andriantsiohaina R, Kleschyov AL. The inducible nitric oxide synthase in vascular and cardiac tissue. *Eur J Pharmacol.* 1999;375:139-55

Sun M, Yokoyama M, Ishiwata T, Asano G. Deposition of advanced glycation end products (AGE) and expression of the receptor for AGE in cardiovascular tissue of the diabetic rat. *Int J Exp Pathol.* 1998;79:207-22

Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR Jr, Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation.* 2000;101:948-954

Szabo C. Role of nitrosative stress in the pathogenesis of diabetic vascular dysfunction. *Br J Pharmacol.* 2009 Feb 6. [Epub ahead of print]

Taddei S, Viridis A, Mattei P, Ghiadoni L, Gennari A, Fasolo CB, Sudano I, Salvetti A. Aging and Endothelial Function in Normotensive Subjects and Patients With Essential Hypertension. *Circulation.* 1995;91:1981-7

Taddei S, Viridis A, Mattei P, Ghiadoni L, Fasolo CB, Sudano I, Salvetti A. Hypertension causes premature aging of endothelial function in humans. *Hypertension.* 1997;29:736-43

Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Salvetti G, Bernini G, Magagna A, Salvetti A. Age-related reduction of NO availability and oxidative stress in humans. *Hypertension.* 2001;38:274-9

Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Versari D and Salvetti A. Endothelium, aging, and hypertension. *Curr Hypertens Rep;* 2006;8:84-89

Tan KC, Chow WS, Ai VH, Metz C, Bucala R, Lam KS. Advanced glycation end products and endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2002;25:1055-9

Targonski PV, Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes DR Jr, Lerman A Coronary endothelial dysfunction is associated with an increased risk of cerebrovascular events. *Circulation.* 2003;107:2805-2809

Taubert D, Berkels R, Grosser N, Schroder H, Grundemann D and Schomig E. Aspirin induces nitric oxide release from vascular endothelium: a novel mechanism of action. *Br J Pharmacol.* 2004;143:159-165

Tauseef M, Sharma KK, Fahim M. Aspirin restores normal baroreflex function in hypercholesterolemic rats by its antioxidative action. *Eur J Pharmacol.* 2007;556:136-43

Taylor PD, Wickenden AD, Mirrlees DJ, Poston L. Endothelial function in the isolated perfused mesentery and aortae of rats with streptozotocin-induced diabetes: effect of treatment with the aldose reductase inhibitor, ponalrestat. *Br J Pharmacol.* 1994;111:42-8

Taylor PD, McCarthy AL, Thomas CR, Poston L. Endothelium-dependent relaxation and noradrenaline sensitivity in mesenteric resistance arteries of streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol.* 1992;107:393-9

Tesfamariam B, Cohen RA. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am J Physiol.* 1992;263:321-6

Tesfamariam B, Palacino JJ, Weisbrod RM, Cohen RA. Aldose reductase inhibition restores endothelial cell function in diabetic rabbit aorta. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993;21:205-11

Ting HH, Timimi FK, Boles KS, Creager SJ, Ganz P, Creager MA. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1996;97:22-8

Toborek M, Kaiser S. Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic Res Cardiol.* 1999;94:295-314

Thornalley PJ. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Arch Biochem Biophys.* 2003;419:31-40

Toyokuni S, Tanaka T, Hattori Y, Nishiyama Y, Yoshida A, Uchida K, Hiai H, Ochi H and Osawa T. Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45.1: its application to ferric nitrilotriacetate-induced renal carcinogenesis model. *Lab Invest* 1997.76:365-374

Vallejo S, Angulo J, Peiro C, Sanchez-Ferrer A, Cercas E, Llergo JL, Nevado J, Sanchez-Ferrer CF, Rodriguez-Manas L. Prevention of endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats by gliclazide treatment. *J Diabetes Complications.* 2000;14:224-33

van der Loo B, Labugger R, Skepper JN, Bachschmid M, Kilo J, Powell JM, Palacios-Callender M, Erusalimsky JD, Quaschnig T, Malinski T, Gygi D, Ullrich V, Lüscher TF. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J Exp Med.* 2000;192:1731-44

Vane JR, Botting RM. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *Inflamm Res.* 1998;47

Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function. *Hypertension*. 1989;13:658-67

Vanhoutte PM. How to assess endothelial function in human blood vessels. *J Hypertens*. 1999;17:1047-58

Vecchione C, Brandes RP. Withdrawal of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors elicits oxidative stress and induces endothelial dysfunction in mice. *Circ Res*. 2002;91:173-9

Vlassara H, Fuh H, Makita Z, Krungkrai S, Cerami A, Bucala R. Exogenous advanced glycosylation end products induce complex vascular dysfunction in normal animals: a model for diabetic and aging complications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:12043-7

Waldman SA, Murad F. Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol Rev*. 1987;39:163-196

Wang YX, Brooks DP, Edwards RM. Attenuated glomerular cGMP production and renal vasodilation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am J Physiol*. 1993;264:952-6

Wautier JL, Zoukourian C, Chappey O, Wautier MP, Guillausseau PJ, Cao R, Hori O, Stern D, Schmidt AM. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *J Clin Invest*. 1996;97:238-43

Wautier JL, Schmidt AM. Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction. *Circ Res*. 2004;95:233-8

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004;27:1047-53

Williams PC, Coffey MJ, Coles B, Sanchez S, Morrow JD, Cockcroft JR, Lewis MJ and O'Donnell VB. In vivo aspirin supplementation inhibits nitric oxide consumption by human platelets. *Blood* 2005.106:2737-2743,

Wolff SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J*. 1987;245:243-50

Wu R, Lamontagne D and De CJ. Antioxidative properties of acetylsalicylic acid on vascular tissues from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circulation*. 2002;105:387-392

Xiong Y, Yuan LW, Deng HW, Li YJ, Chen BM. Elevated serum endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and endothelial dysfunction in aged rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001;28:842-7

Xu B, Chibber R, Ruggiero D, Kohner E, Ritter J, Ferro A. Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation end products. *FASEB J*. 2003;17:1289-91

Yamagishi S, Fujimori H, Yonekura H, Yamamoto Y, Yamamoto H. Advanced glycation endproducts inhibit prostacyclin production and induce plasminogen activator inhibitor-1 in human microvascular endothelial cells. *Diabetologia*. 1998;41:1435-41

Yamagishi S, Takeuchi M, Inagaki Y, Nakamura K, Imaizumi T. Role of advanced glycation end products (AGEs) and their receptor (RAGE) in the pathogenesis of diabetic microangiopathy. *Int J Clin Pharmacol Res*. 2003; 23:129 - 134

Yokokawa K, Kohno M, Murakawa K, Yasunari K, Takeda T. Effect of endothelin-1 on cytosolic calcium ions in cultured human endothelial cells. *J Hypertens*. 1990;8:843-9

Zalba G, Beaumont FJ, San José G, Fortuño A, Fortuño MA, Etayo JC, Díez J. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2000;35:1055-61

Zhang QY, Dunbar D and Kaminsky LS. Characterization of mouse small intestinal cytochrome p450 expression. *Drug Metab Deposition* 2003;31:1346-1351

Zhang C, Hein TW, Wang W, Chang CI, Kuo L. Constitutive expression of arginase in microvascular endothelial cells counteracts nitric oxide-mediated vasodilatory function. *FASEB J*. 2001;15:1264-6

Zhou Z, Wang K, Penn MS, Marso SP, Lauer MA, Forudi F, Zhou X, Qu W, Lu Y, Stern DM, Schmidt AM, Lincoff AM, Topol EJ. Receptor for AGE (RAGE) mediates neointimal formation in response to arterial injury. *Circulation*. 2003;107:2238-43

Zou Y, Jung KJ, Kim JW, Yu BP, and Chung HY. Alteration of soluble adhesion molecules during aging and their modulation by calorie restriction. *FASEB J*. 2004;18:320-2

Zou Y, Yoon S, Jung KJ, Kim CH, Son TG, Kim MS, Kim YJ, Lee J, Yu BP, Chung HY. Upregulation of Aortic Adhesion Molecules During Aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*.2006;61:232-244

Zoukourian C, Wautier MP, Chappay O, Dosquet C, Rohban T, Schmidt AM, Stern D, Wautier JL. Endothelial cell dysfunction secondary to the adhesion of diabetic erythrocytes. Modulation by iloprost. *Int. Angiol*. 1996;15:195-200

ADDENDUM

P 22

La migration des cellules musculaires lisses de la media vers l'intima

P 71.

Tiemann K, Weyer D, Djoufack PC, Ghanem A, Lewalter T, Dreiner U, Meyer R, Grohe C, Fink KB. Increasing myocardial contraction and blood pressure in C57BL/6 mice during early postnatal development. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284:464-74

Koga T, Takata Y, Kobayashi K, Takishita S, Yamashita Y and Fujishima M. Ageing suppresses endothelium-dependent relaxation and generates contraction mediated by the muscarinic receptors in vascular smooth muscle of normotensive Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 1988;6: S243-S245

P 73.

Lakatta EG. Cardiovascular aging research: the next horizons. *J Am Geriatr Soc.* 1999;47:613-25.

Wang M, Lakatta EG. In situ imbalance of matrix metalloproteinase-2 activators and inhibitors in age associated aortic remodeling. *Hypertension.* 2002;39:865-873.

P 74.

Orlandi A, Marcellini M, Spagnoli LG. Aging influences development and progression of early aortic atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1123-1136.

Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev.* 1995;75:487-517.

Schwartz SM, Heimark RL, Majesky M. Developmental mechanisms underlying pathology of arteries. *Physiol. Rev.* 1990; 70: 1177-209

P 75.

Boulanger E, Wautier MP, Wautier JL, Boval B, Panis Y, Wernert N, Danze PM, Dequiedt P. AGEs bind to mesothelial cells via RAGE and stimulate VCAM-1 expression. *Kidney Int.* 2002;61:148-56

Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest.* 1997;99:457-68

Cheng R, Lin B, Ortwerth BJ. Rate of formation of AGEs during ascorbate glycation and during aging in human lens tissue. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1587:65-74.

G Münch, B Kuhla, H-J Lüth, T Arendt, S R Robinson. Anti-AGEing defences against Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31: 1397-1399

Schmidt AM, Hori O, Brett J, Yan, Wautier JL, Stern D. Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arterioscler Thromb .1994 ; 14 : 1521-1528*

Schmidt AM, Shi Du Yan, Wautier JL, Stern D. Activation of Receptor for Advanced Glycation End Products A Mechanism for Chronic Vascular Dysfunction in Diabetic Vasculopathy and Atherosclerosis. *Circ Res* 1999 ;84 :489-497

P 76.

Hamilton CA, Brosnan MJ, McIntyre M et al. Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension* 2001;37:529-34