



**HAL**  
open science

# Induction de la sénescence endothéliale par le high glucose : rôle des transporteurs SGLT1 et SGLT2

Sonia Khemais

► **To cite this version:**

Sonia Khemais. Induction de la sénescence endothéliale par le high glucose : rôle des transporteurs SGLT1 et SGLT2. Pharmacologie. Université de Strasbourg, 2017. Français. NNT : 2017STRAJ081 . tel-01709177

**HAL Id: tel-01709177**

**<https://theses.hal.science/tel-01709177>**

Submitted on 14 Feb 2018

**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 STRASBOURG

*ÉCOLE DOCTORALE 414-Sciences de la vie et de la santé*  
*UMR 7213 CNRS: Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie*

## THÈSE

Présentée par :

**Sonia KHEMAIS-BENKHIAT**

Soutenue le : 02 Octobre 2017

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Pharmacologie clinique et préclinique**

***Induction de la sénescence endothéliale  
par le high glucose :  
Rôle des transporteurs SGLT1 et 2***

**THÈSE dirigée par :**

**Pr Valérie SCHINI-KERTH**  
**Pr Florence TOTI**

Université de Strasbourg-France  
Université de Strasbourg-France

**RAPPORTEURS :**

**Dr Anne BOULOUMIE**  
**Pr Carlos SANCHEZ-FERRER**

Université de Toulouse III-France  
Université de Madrid-Espagne

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Pr Dominique STEPHAN**  
**Pr Paul VANHOUTTE**

Nouvel Hôpital Civil de Strasbourg-France  
Université de Hong Kong-Chine

## Remerciements

Je tiens à remercier mes rapporteurs de thèse, le Docteur Anne Bouloumié et le Professeur Carlos Sanchez-Ferrer pour le temps que vous avez consacré à la lecture et l'évaluation de ce manuscrit.

Je remercie également les membres du jury, le Professeur Paul Vanhoutte et le Professeur Dominique Stephan ainsi que le Docteur Éric Mayoux pour avoir accepté de participer à l'évaluation de ma thèse.

Je voudrais adresser mes remerciements les plus profonds et les plus sincères à ma directrice de thèse, Madame le professeur Valérie Schini-Kerth pour son suivi rigoureux et son investissement personnel depuis l'entame de mon stage de master. Elle a toujours su me guider dans mes réflexions et m'a permis de développer un esprit scientifique critique. Elle a su m'apprendre à me poser les bonnes questions et à tempérer mes enthousiasmes excessifs par la prudence, indispensable qualité que requiert l'interprétation scientifique. De par sa grande culture scientifique, sa force tranquille et sa douceur naturelle, elle fut pour moi un modèle.

Je remercie également ma co-directrice de thèse, Madame le professeur Florence Toti, pour son soutien et son intérêt, sa grande disponibilité et ses nombreux conseils pédagogiques. Outre son apport scientifique, elle a toujours été à l'écoute de ses étudiants. De par ses qualités humaines, elle m'a donné une autre vision de la recherche. Je lui adresse toute ma reconnaissance.

Je veux citer également, notre chargé de recherche, le docteur Cyril Auger, pour sa disponibilité, son partage de connaissances, et sa générosité naturelle. Merci pour les discussions scientifiques enrichissantes et les nombreux moments divertissants autour d'un café ou un PhD comics.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans l'aide et la disponibilité que m'ont témoigné mes collègues post doctorants, doctorants, stagiaires et techniciens. Merci pour tous les moments conviviaux passés ensemble.

Je tiens aussi à remercier l'équipe de la Pharmacie des Alpes, et en particulier les Drs Richard Vogt et Hughes François pour leur soutien au cours de mon évolution professionnelle.

Au terme de ce parcours, je remercie enfin celles et ceux qui me sont chers. Je pense à ma mère, mon modèle de force et de ténacité, je n'y serai pas arrivée sans tes prières. À mon frère AbdelGhani et ma sœur Dalel, qui m'ont toujours soutenu, aidé et porté vers l'avant. Sans oublier le soutien affectif de toute ma famille en France et en Algérie.

Enfin, j'ai une pensée toute particulière pour toi Said, mon époux, à mes côtés dans tous les moments difficiles, tu as su m'indiquer le cap sans relâche ni faiblesse et m'assurer ta confiance indéfectible dans mes choix. Sans toi je n'aurais jamais pu réaliser ce travail.

Wassim et Amine, mes enfants que j'ai quelque peu délaissés ces derniers mois pour achever cette thèse. Vos incessantes questions hasardeuses ont peut-être parfois aiguillé mes recherches, merci aussi pour votre patience.

Mille mercis à toutes et à tous de m'avoir conduit à ce jour mémorable.

*À mon père, te rendre fier a été mon seul dessein...*

## Table des matières

Listes des Figures	v
Production scientifique	vi
Publications	vi
Communications scientifiques orales	vii
Communications scientifiques affichées	vii
Prix et distinctions	viii
Liste des abréviations	ix
Introduction	1
Chapitre 1 : L'endothélium sain maintient l'homéostasie vasculaire	2
I- L'endothélium régule le tonus vasculaire	3
I-1 <i>Le monoxyde d'azote (NO)</i>	3
I-2 <i>La prostacycline PGI<sub>2</sub></i>	5
I-3 <i>Le Facteur Hyperpolarisant Dérivé de l'Endothélium</i>	6
II- L'endothélium limite le remodelage vasculaire	8
III- Endothélium et réponse hémostatique	8
IV- L'endothélium s'oppose aux processus d'athérogenèse	10
Chapitre 2 : La dysfonction endothéliale	12
I- La dysfonction endothéliale, un élément central des pathologies vasculaires	12
I-1 <i>Mécanismes impliqués dans la dysfonction endothéliale</i>	12
I-1.1 <i>La perte des facteurs vasodilatateurs</i>	12
I-1.2 <i>L'augmentation des facteurs vasoconstricteurs endothéliaux</i>	12
I-2 <i>Conditions physiopathologiques associées à la dysfonction endothéliale</i>	15
I-2.1 <i>La dysfonction endothéliale liée aux facteurs de risque cardiovasculaire</i>	15
I-2.2 <i>La dysfonction endothéliale liée à l'âge</i>	17
II- Le stress oxydant à l'origine de la dysfonction endothéliale	18
I-1 mécanismes du stress oxydant	18
II-2 Stress oxydant et physiopathologie vasculaire	19
II-3 Sources enzymatiques des ROS	20
II-4 Rôle du système angiotensine dans la dysfonction endothéliale	22
II-5 Conséquences de l'activation du système RAS dans les vaisseaux	23
Chapitre 3 : La sénescence endothéliale	25

<b>I- La sénescence cellulaire</b>	25
<i>I.1 Caractéristiques des cellules sénescentes</i>	25
<i>I.2 Mécanismes de la sénescence</i>	27
<i>I.2.1 La sénescence répllicative</i>	27
I.2.1.1 Synthèse des télomères	28
<i>I.2.2 La sénescence prématurée</i>	29
<i>I.3 Régulation du cycle cellulaire</i>	31
<i>I.4 Mécanisme de l'arrêt du cycle cellulaire dans la sénescence</i>	32
<b>II- Contribution de la sénescence cellulaire dans vieillissement vasculaire</b>	33
<i>II-1 Sénescence et dysfonction endothéliale</i>	35
<i>II-2 Le stress oxydant à l'origine de la sénescence endothéliale</i>	36
<i>II-3 Rôle du système Angiotensine dans la sénescence vasculaire</i>	37
<b>Chapitre 4 : Diabète, sénescence et dysfonction endothéliale</b>	40
<b>I- Le diabète</b>	40
<i>I.1 Epidémiologie du diabète</i>	40
<i>I.2 Physiopathologie et génèse du diabète</i>	41
<i>I.3 Traitements du diabète</i>	42
<i>I.4 Complications du diabète</i>	42
<b>II- Hyperglycémie et toxicité vasculaire (glucotoxicité)</b>	44
<i>II-1 L'hyperglycémie et dysfonction endothéliale et vasculaire</i>	44
<i>II-2 Hyperglycémie et inflammation</i>	45
<i>II-3 Hyperglycémie et stress oxydant</i>	45
II-3.1 Auto-oxydation du glucose	46
II-3.2 Les produits avancés de la glycation (AGEs)	46
II-3.3 La voie des polyols	47
II-3.4 L'activation de la protéine kinase C par le diacylglycérol	47
II-3.5 La voie de l'hexoamine	48
<i>II-4 L'hyperglycémie et la sénescence endothéliale</i>	48
II-4.1 Rôle du système angiotensine dans la sénescence induite par l'hyperglycémie	49
<b>III- Le diabète comme facteur de risque cardiovasculaire</b>	50
<b>IV- Impact du contrôle glycémique sur le risque cardiovasculaire</b>	51
<i>IV-1 Chez les patients atteints de DT1</i>	51
IV-1.1 L'étude DCCT (Diabetes Control and Complications Trial)	51
IV-1.2 L'étude EDIC (Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications)	51

<b>IV-2 Chez les patients atteints de DT2</b>	52
IV-2.1 L'étude UKPDS (UK Prospective Diabetes Study)	52
IV-2.2 L'étude ACCORD (Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes)	54
IV-2.3 L'étude ADVANCE (Action in Diabetes and Vascular Disease)	55
IV-2.4 L'étude VADT (Veterans Affairs Diabetes Trial)	56
<b>V- L'hyperglycémie et les facteurs de risque CV sont à l'origine des macroangiopathie diabétique</b>	57
V-1 L'étude Steno-2	58
<b>VI- Nouvelles exigences des autorités sanitaires dans la prise en charge du DT2</b>	61
VI-1 Les anciens antidiabétiques et protection cardiovasculaire	62
VI-2 Les antidiabétiques de nouvelle génération et protection cardiovasculaire	64
VI-2.1 Les incrétonomimétiques	64
VI-2.2 Une nouvelle classe d'antidiabétiques : les gliflozines	66
<b>VII- Les transporteurs de glucose</b>	67
VII-1 Les GLUTs (glucose transporter)	67
VII-2 Les SGLTs	67
VII-2.1 Le SGLT1	68
VII-2.2 Le SGLT2	68
VII-2.3 Modulation de l'expression de SGLT1 et SGLT2 en conditions pathologiques	70
<b>VIII- Les inhibiteurs des SGLT2</b>	73
VIII-1 Découverte des inhibiteurs des SGLT2	73
VIII-2 Mécanisme d'action des inhibiteurs de SGLT2	73
VIII-3 L'Empagliflozine, un inhibiteur sélectif de SGLT2	75
VIII-3.1 Etude de l'efficacité clinique de l'Empagliflozine	76
VIII-3.2 Etude EMPA-REG OUTCOME	77
<b>IX- Mécanismes potentiels de la baisse de mortalité CV avec l'Empagliflozine</b>	79
IX-1 Modulation des facteurs de risque CV	79
IX-2 Effet de l'empagliflozine sur l'athérosclérose	80
IX-3 Protection de la fonction rénale par l'empagliflozine	81
IX-4 Faible risque hypoglycémique	82
IX-5 Amélioration de la sensibilité à l'insuline	82
IX-6 Utilisation des corps cétoniques comme substrats énergétiques	82
IX-7 Effet sur le transport de l'oxygène	84
IX-8 Effet sur la fonction endothéliale	84

<b>Chapitre 5 : Protection cardiovasculaire par les polyphénols</b>	85
<b>I- Définition des polyphénols</b>	85
<b>II- Les polyphénols améliorent la fonction endothéliale <i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i></b>	86
<b>III- Les polyphénols améliorent la fonction endothéliale <i>in vivo</i></b>	87
<b>IV- Biodisponibilité et distribution des polyphénols</b>	88
<b>V- Entrée des polyphénols dans les Ces</b>	89
<b>VI- Polyphénols et diabète</b>	89
<b>Hypothèses de travail</b>	91
<b>Article 1 : Publié dans Journal of Gerontology.</b>	93
<b>Article 2 : soumis à Cardiovascular Research.</b>	104
<b>Etude complémentaire</b>	137
<b>Discussion</b>	165
<b>Vieillessement physiologique : Rôle du système angiotensine local</b>	165
<b>Vieillessement accéléré par l'hyperglycémie :</b>	
<b>Rôle des transporteurs SGLTs et du système angiotensine</b>	170
<b>Protection du vieillissement vasculaire par les polyphénols :</b>	
<b>Rôle des transporteurs SGLTs</b>	181
<b>Conclusion générale</b>	184
<b>Références</b>	185

## Listes des figures

<b>Figure 1</b> : Structure de paroi vasculaire	2
<b>Figure 2</b> : Mécanisme de production de NO par la eNOS	4
<b>Figure 3</b> : Mécanismes de relaxation vasculaire dépendants de l'endothélium	7
<b>Figure 4</b> : Mécanismes protecteurs de l'homéostasie vasculaire dépendants de l'endothélium	11
<b>Figure 5</b> : Mécanismes moléculaires impliqués dans la dysfonction endothéliale	15
<b>Figure 6</b> : Mécanismes de production de ROS par la NADPH oxydase	21
<b>Figure 7</b> : Caractéristiques des cellules sénescentes	27
<b>Figure 8</b> : Le raccourcissement des télomères induit la sénescence	29
<b>Figure 9</b> : Régulation du cycle cellulaire par les complexes CDK-Cyclin	31
<b>Figure 10</b> : Activation de E2F par le complexe CDK-cycline	32
<b>Figure 11</b> : Estimation de la prévalence mondiale du diabète en 2030	40
<b>Figure 12</b> : Complications macroangiopathiques et microangiopathiques du diabète	43
<b>Figure 13</b> : Résumé des études cliniques concernant le contrôle glycémique et le risque cardiovasculaire	57
<b>Figure 14</b> : schéma du développement des antidiabétiques	62
<b>Figure 15</b> : Résumé des études cliniques concernant les incrétinomimétiques et protection cardiovasculaire	66
<b>Figure 16</b> : Le transport du glucose via les SGLTs	69
<b>Figure 17</b> : Mécanisme d'action des inhibiteurs de SGLT2	74
<b>Figure 18</b> : Tableau représentatifs des différents inhibiteurs de SGLT2	76
<b>Figure 19</b> : Résultats de l'étude EMPA-REG	78
<b>Figure 20</b> : Résultats de l'étude EMPA-REG	79
<b>Figure 21</b> : Les flavonoïdes et leurs principales sources	86
<b>Figure 22</b> : Schéma récapitulant le rôle du système angiotensine local dans l'induction de la sénescence	168
<b>Figure 23</b> : Schéma récapitulant les mécanismes impliqués dans l'induction de la sénescence endothéliale en réponse au HG	178



## Production scientifique

### Publications

**S. Khemais-Benkhiat**, N. Idris-Khodja, T. Porto Ribeiro, G. Silva, M. Abbas, M. Kheloufi, J. Lee, F. Toti, C. Auger, V. Schini-Kerth. The Redox-sensitive Induction of the Local Angiotensin System Promotes Both Premature and Replicative Endothelial Senescence: Preventive Effect of a Standardized *Crataegus* Extract. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* (2016) 71 (12): 1581-1590

**S. Khemais-Benkhiat**, N. Idris-Khodja, S. Park, L. Amoura, M. Abbas, C. Auger, L. Kessler, E. Mayoux, F. Toti, V. B. Schini-Kerth. Redox-sensitive upregulation of SGLT2 expression mediates the high glucose-induced premature endothelial cell senescence and acquisition of pro-atherothrombotic markers via the activation of the local angiotensin system. Soumis à cardiovascular reaserch.

**S. Khemais-Benkhiat**, H. Lee, E. Belcastro, S. Gaertner, G. Rasata-Manantena, C. Auger, F. Toti, V.B. Schini-Kerth. Anthocyanin-rich backcurrant extract prevents replicative and premature endothelial senescence: Role of Glucose transporters SGLTs. en préparation.

G. Silva, M. Abbas, **S. Khemais-Benkhiat**, M. Burban, T. Porto Ribeiro, N. Idris-Khodja, F. Toti, S. Côrtes, V. B. Schini-Kerth. Replicative senescence promotes prothrombotic responses in endothelial cells Role of NADPH oxidase and cyclooxygenase-derived oxidative stress. *Exp Gerontol*. 2017; 93: 7-15.

Kassem M, Rasul Z, Abbas M, El Habhab A, Kreutter G, **Khemais-Benkhiat S**, Auger C, Antal M, Schini-Kerth V, Toti F, Kessler L, Senescence of pancreas in middle-aged rats with normal vascular function. *Ann Transplant*, 2017; 22: 177-186

L. Amoura, R. Hannon, **S. Khemais-Benkhiat**, AW. Qureshi, S. Park , S. Sahraoui, Schini-Kerth V, Kessler L, Toti F .Tissue microparticles as methodological tools in the pharmacological assessment of thrombogenicity . In preparation

El Habhab A, Abbas M, Kreutter G, Kassem M, **Khemais-Benkhiat S**,, Zobairi F, Yver B, Schini-Kerth V, Kessler L, Toti F. Leukocyte-derived microparticles favors endothelial senescence: significance for pancreatic islets transplantation. In preparation

## Communications scientifiques orales

**S. Khemais-Benkhiat**, M. Abbas, P.N. Nguyen, C. Auger, F. Toti, E Mayoux, L. Kessler, V.B. Schini-Kerth. Empagliflozin, a selective sodium glucose co-transporter 2 inhibitor, prevents the high glucose-induced senescence in cultured endothelial cells: Role of NADPH oxidase and cyclooxygenases, Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique, Rouen, 19-21 Avril 2017

**S. Khemais-Benkhiat**, Nouredine Idris-Khodja, Malak Abbas, Phuong. Nguyen, Cyril Auger, Eric Mayoux, Laurence Kessler, Florence Toti, Valerie Schini-Kerth. Role of sodium glucose co-transporter 2 in high glucose-induced endothelial senescence: Preventif effect of Empagliflozin, Journées du Campus d'Illkirch (JCI), Illkirch, 27-28 Mars 2017

El Habhab A, Abbas M, Kassem M, Kreutter G, **S. Khemais-Benkhiat**, Zobairi F, Auger C, Schini-Kerth V, Toti F, Kessler L. Effet pro-sénescence des microparticules leucocytaires sur les cellules endothéliales: un nouveau mécanisme possible contribuant à l'IBMIR lors de la transplantation des îlots, (Société Francophone de la Transplantation) 1-4 décembre, Lille-France 2015

## Communications scientifiques affichées

**S. Khemais-Benkhiat**, M. Abbas, P.N. Nguyen, C. Auger, F. Toti, E Mayoux, L. Kessler, V.B. Schini-Kerth. L'empagliflozine, un inhibiteur spécifique de SGLT2, prévient la sénescence induite dans les cellules endothéliales par des concentrations élevées de glucose, *Congrès annuel de la Société Francophone du Diabète, Lyon-22-25 Mars 2016.*

**S. Khemais-Benkhiat**, M. Abbas, P.N. Nguyen, C. Auger, F. Toti, E Mayoux, L. Kessler, V.B. Schini-Kerth. Empagliflozin, a selective sodium glucose co-transporter 2 inhibitor, prevents the high glucose-induced senescence in cultured endothelial cells: Role of NADPH oxidase and cyclooxygenases, *76ième congrès international de l'American Diabetes Association, Nouvelle-Orléans, USA 10-14 juin 2016.*

**S. Khemais-Benkhiat**, M. Abbas, P.N. Nguyen, C. Auger, F. Toti, E Mayoux, L. Kessler, V.B. Schini-Kerth. L'empagliflozine, un inhibiteur spécifique de SGLT2, prévient la sénescence induite dans les cellules endothéliales par des concentrations élevées de glucose. *Printemps de la Cardiologie, 10<sup>ième</sup> Congrès annuel de la Société Française de Cardiologie, Dijon, 7-8 avril 2016*

**S. Khemais-Benkhiat**, N. Idris-Khodja, S. Park, L. Amoura, M. Abbas, C. Auger, L. Kessler, E. Mayoux, F. Toti, V. B. Schini-Kerth. Redox-sensitive upregulation of SGLT2 expression mediates the high glucose-induced premature endothelial cell senescence and acquisition of pro-atherothrombotic markers via the activation of the local angiotensin system. European Symposium Vascular Biomaterials, Strasbourg, 12-14 October 2017.

### **Prix et distinctions**

**JCI 2017** : Journée Campus d'Illkirch, Prix de la meilleure présentation orale

## Liste des abréviations

53BP1	p53 binding protein
8-OH-G	8-hydroxydeoxyguanosine
AA	Acide arachidonique
ACCORD	Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes
ACE	Enzyme de conversion de l'angiotensine
Ach	Acétylcholine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate,
AGEs	Advanced Glycation End products
Akt	Protéine kinase B
AMPc	Adénosine monophosphate 3', 5' cyclique
AngII	Angiotensine II
ANOVA	Analyse Of Variance
AP-1	Activator protein 1
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
AVC	Accident vasculo cérébral
BCE	Black carent extract
BH <sub>4</sub>	Tétrahydrobioptérine
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcium
CAC	Coronary artery calcification
CDK	Cyclin dependent kinases
CE	Cellule Endothéliale
cGMP	Guanosine monophosphate 3', 5' cyclique
CHK	Checkpoint kinase

CKI	Inhibiteur des CDK
CML	Cellule musculaire lisse
COX	Cyclooxygénase
Ct	Cycle threshold
DAG	Diacylglycérol
DAPI	Diamidino-2-phénylindole
DDR	DNA Damage Response
DPP-4	Dipeptidyl peptidase-4
DT2	Diabète de type 2
EDCF	Facteur contracteur dérivé de l'endothélium (Endothelium Derived Contracting Factor)
EDHF	Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (Endothelium Derived Hyperpolarising Factor)
EDRF	Facteur relaxant dérivé de l'endothélium (Endothelium-Derived Relaxing Factor)
EMA	European Medicines Agency
eNOS	NO synthase endothéliale (NOSIII)
EPC	Cellule Endothéliale Progénitrice (Endothelial Progenitor Cell)
ERK	Extracellular signal-regulated protein kinase
ET	Endothélin
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FDA	Food and Drug Administration
FID	Fédération Internationale du Diabète
FMD	Flow Mediated Dilatation
FMN	Flavine mononucléotide
FoxO1	Forkhead box O1
FRG	Glycosuries rénales familiales
FRS	Framingham Risk Score
FT	Facteur tissulaire
GAPDH	Glyceraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase
GC	Guanylyl Cyclase

GCs	Guanylyl Cyclase soluble
GFAT	Glutamine: fructose-6 phosphate amidotransférase
GFR	Taux de filtration glomérulaire
GGM	Malabsorption intestinale de glucose-galactose
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
GLUT	Glucose transporter
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GSH	Glutathione
GTP	Guanosine triphosphate
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HAEC	Cellules endothéliales aortiques humaines
HbA1c	Hémoglobine glyquée
HDL	High Density Lipoprotein
HEK	Human Embryonic Kidney
HMG-coA	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA réductase
HO <sub>2</sub> •	Hydroperoxyl
HTA	Hypertension artérielle
HUVEC	Human umbilical veins endothelial cells)
IC	Indice de confiance
ICAM-1	InterCellular Adhesion Molecule-1
IDM	Infarctus du myocarde
IEC	Inhibiteurs de l'enzyme de conversion
IK <sub>Ca</sub>	Canaux potassiques dépendants du calcium de moyenne conductance
IL	Interleukine
IMC	Indice masse corporelle
IMT	Epaisseur intima-media
INF	Interféron
iNOS	NO synthase inductible (NOSII)
IP	Récepteur de la prostacycline

Kir	Canaux potassiques rectifiant entrant
KO	Knock out
LDL	Low Density Lipoprotein
L-NAME	Ester méthylique de nitro-L-arginine
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCP-1	Macrophage Chemottractant Protein-1
MCV	Maladie cardiovasculaire
mdm2	Murine double minute 2
MEK	MAPK/ERK kinase
MG	Méthyl-glyoxal
MMP	Matrix metalloproteinase
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
NAC	N-acetyl-L-cystéine
NaCl	Chlorure de sodium
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NANC	Non-adrénergique non-cholinergique
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor-kappa B
NO	Monoxyde d'azote
NOS	NO synthase
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Superoxyde
OH <sup>•-</sup>	Ion hydroxyle
OIS	Oncogene-induced senescence
ONOO <sup>•-</sup>	Peroxynitrite
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PAR	Protease activated receptor
PAS	Pression artérielle systolique
PBS	Tampon phosphate salin (Phosphate Buffered Solution)
PCR	Polymerase Chain Reaction

PGI <sub>2</sub>	Prostacycline
PGIS	Prostacycline synthase
PI3	Kinase phosphoinositide 3-kinase
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PKG	Protéine kinase G
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	Phospholipase C
PMA	Acide myristique du phorbol
PPAR $\delta$	Peroxisome proliferator-activated receptor beta or delta
RAGE	Advanced Glycation End products receptor
RAS	Système rénine-angiotensine
Rb	Rétinoblastome
AT-1R	Récepteur 1 de l'angiotensine
AT- 2R	Récepteur 2 de l'angiotensine
ROS	Espèces réactives oxygénées
sAD	Adénylyl cyclase soluble
SAHF	Senescence-associated heterochromatin foci
Sartans	Antagonistes des récepteurs AT-1 de l' Ang II
SASP	Phénotype sécrétoire associé à la sénescence
SA- $\beta$ -Gal	Senescence Associated $\beta$ -galactosidase
SDS-PAGE	Sodium dodécyl sulfate poly acrylamide gel electrophoresis
SEM	Standard Error of the Mean
SERCA	Sarco/endoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> ATPase
SGLT	Sodium glucose co-transporter
SIPS	Stress-induced premature senescence
SK <sub>Ca</sub>	Canaux potassiques calcium dépendants de faible conductance
SNP	Nitroprussiate de sodium
SOD	Superoxyde dismutase



STZ	Streptozotocine
TERC	Telomerase RNA Component
TERT	Telomere Reverse Transcriptase
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
TNF- $\alpha$	facteur tumoral de nécrose- $\alpha$
TP	Récepteur du thromboxane
t-PA	Tissue-type Plasminogen Activator
TXA2	Thromboxane A2
U.V.	Rayons Ultra-Violets
UDP-GlcNAc	Uridine diphosphate-N-acétylhexosamine
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor

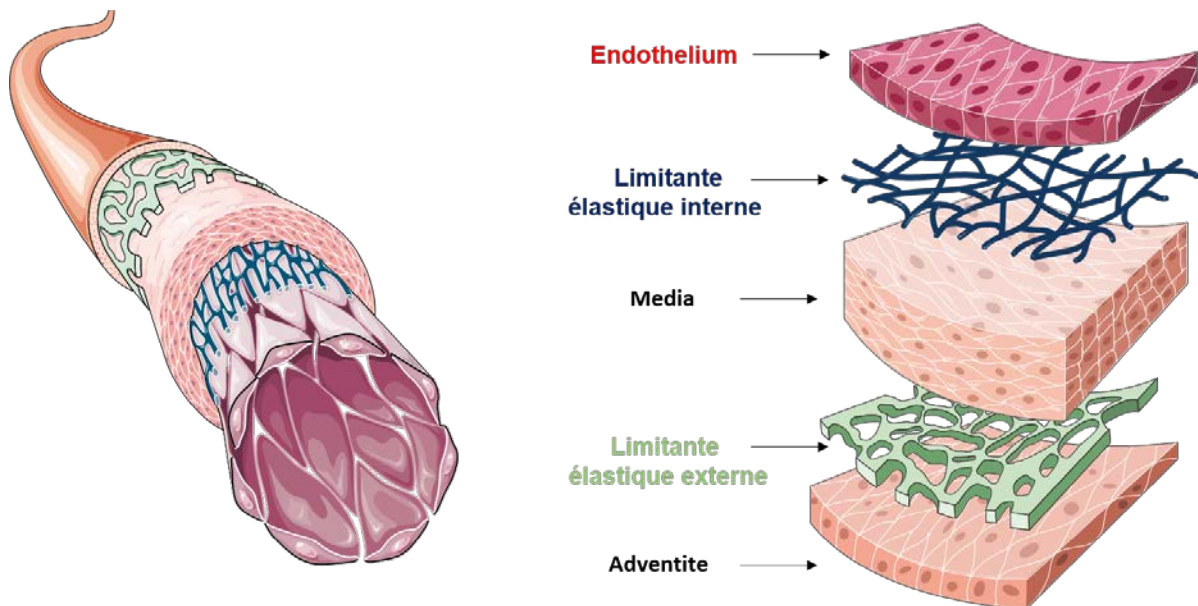
# **Introduction**

## **Introduction**

L'âge et le diabète sont deux facteurs de risque cardiovasculaires majeurs. De nombreuses études ont démontré que la dysfonction endothéliale, associée à une perte des propriétés vasoprotectrices de l'endothélium, constitue un facteur clé contribuant à la pathogénèse des maladies vasculaires chez le sujet âgé et chez le diabétique. Récemment, il a été suggéré que la sénescence endothéliale pourrait contribuer à l'initiation et au développement de la dysfonction endothéliale. L'objet de cette thèse est l'étude du vieillissement de l'endothélium vasculaire d'une part dans un modèle de sénescence répliquative reflétant le vieillissement physiologique, et d'autre part dans un modèle de sénescence prématurée induit par une concentration élevée de glucose afin de mimer l'hyperglycémie chronique observée chez le diabétique.

## Chapitre 1 : L'endothélium sain maintient l'homéostasie vasculaire

La paroi vasculaire est composée de 3 couches, qui sont du côté extraluminal vers la lumière du vaisseau: l'adventice, constituée de tissu conjonctif, la média, constituée de cellules musculaires lisses, et au contact du sang, l'intima ou l'endothélium.



**Figure 1 : Structure de paroi vasculaire d'après servier-medical-art**

L'endothélium vasculaire est la couche la plus interne qui tapisse l'intérieur de tous les vaisseaux sanguins (cf. Figure 1). Il est composé d'une monocouche de cellules endothéliales (CEs) reliées entre elles par une matrice extra cellulaire (collagène, glycoprotéines). Jusqu'au début des années quatre-vingt, il a été considéré comme une membrane inerte. Depuis, de nombreuses études ont démontré qu'il s'agissait d'un organe multifonctionnel avec des fonctions autocrines, paracrines et endocrines importantes. En effet, depuis la découverte par John Zawadzki et Robert Furchgott de l'effet vasorelaxant de l'acétylcholine sur des segments isolés d'aorte de lapin, les travaux de différentes équipes (dont celle de Louis Ignarro et Ferid Murad) ont cheminé jusqu'à la découverte de la nature du facteur endothélial et du mécanisme induisant la vasorelaxation, récompensée par le prix Nobel de médecine en 1998. Cette découverte historique a ouvert une nouvelle ère dans la biologie vasculaire et a influencé la pratique clinique actuelle.

L'endothélium vasculaire joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie vasculaire. Son emplacement stratégique en tant que barrière physique qui sépare le sang circulant des tissus sous-jacents, lui confère la possibilité de réguler le tonus vasculaire, l'hémostase et la thrombogénèse.

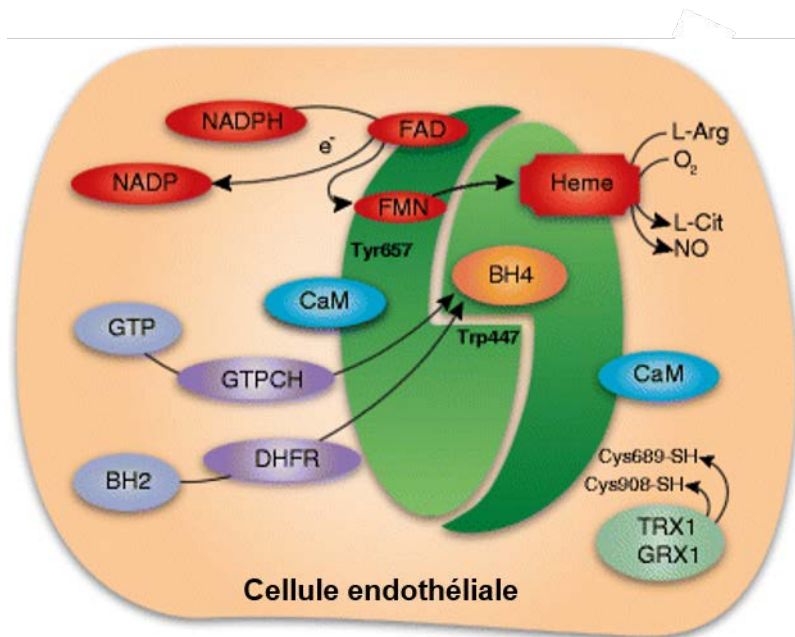
## **I- L'endothélium régule le tonus vasculaire**

Les CEs régulent le tonus vasculaire via la libération de substances vasoactives puissantes, appelées facteurs relaxants dérivés de l'endothélium (EDRF), impliquant le monoxyde d'azote (NO, Furchgott *et al.*, 1980), la prostacycline (PGI<sub>2</sub>, Moncada *et al.*, 1979) et les Hyperpolarisations Dérivées de l'Endothélium (EDH) (Kause *et al.*, 1989 ; Nagao et Vanhoutte, 1992).

### ***I-1 Le monoxyde d'azote (NO)***

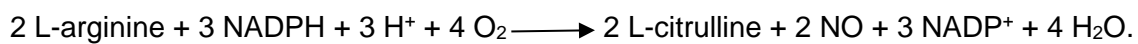
Le NO est un gaz soluble généré à partir de L-arginine par une famille d'enzymes calmoduline-dépendantes, les NO synthases (NOS). Il existe trois isoformes de NOS. La NOS provenant des cellules endothéliales (eNOS) et celle des neurones (nNOS), sont des enzymes constitutivement exprimées et dont les activités sont stimulées par l'augmentation du calcium cytosolique. La troisième isoforme est une NOS inductible dont l'activité est indépendante du calcium (iNOS). Elle est impliquée dans les défenses immunitaires et son expression nécessite une activation par des stimuli pro-inflammatoires tels que l'Il-1  $\beta$  ou l'interféron  $\gamma$ .

Les trois NOS utilisent la forme réduite du NADP (*Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate*), le NADPH comme donneur d'électrons et emploient plusieurs cofacteurs: les flavines (FAD et FMN), l'hème, la tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>) et du zinc afin de catalyser l'oxydation de la L-arginine en présence d'oxygène moléculaire. Les NOS contiennent un domaine réductase sur lequel se trouvent les sites de liaison du NADPH et des flavines et un domaine oxygénase portant les sites de liaison de l'hème, de la L-arginine et du BH<sub>4</sub>. Entre les deux domaines se trouve le site de liaison de la calmoduline. L'activité des NOS nécessite une dimérisation. L'hème et un ion de zinc tétra-coordonné par quatre thiols (deux de chaque monomère) jouent un rôle essentiel dans la formation de l'homodimère, le BH<sub>4</sub> quant à lui, stabilise le dimère une fois formé. Le thiolate de zinc et le BH<sub>4</sub> sont sujets à l'oxydation par le peroxy-nitrite. Ce dernier, en réduisant les groupements thiols, induit la dissociation des dimères de la NOS en monomères. On parle alors d'une NOS découplée.



**Figure 2 : Mécanisme de production de NO par la eNOS (Siragusa et Fleming, 2016)**

La génération de NO implique deux étapes indépendantes. La première est l'hydroxylation de la L-arginine en N<sup>G</sup>-hydroxy-arginine. La deuxième étape mène à la génération de NO avec la formation stœchiométrique de L-citrulline. Le bilan réactionnel est le suivant.



Les niveaux les plus élevés de NO se trouvent dans les neurones, où le NO fonctionne comme un neurotransmetteur non-adrénergique non-cholinergique (NANC). Cette voie NANC joue un rôle particulièrement important dans la relaxation des muscles lisses dans la circulation cérébrale et dans les voies gastro-intestinales, uro-génitales et respiratoires. La dérégulation de l'activité de la nNOS dans les nerfs autonomes joue un rôle majeur dans diverses pathologies, telles que la migraine, la sténose pylorique hypertrophique et l'impuissance masculine (Bredt, 2009).

Les CE libèrent le NO en réponse aux forces de cisaillements exercées par le flux sanguin et à une grande variété d'autacoïdes (bradykinine, ADP/ATP, endothéline-1), hormones (angiotensine II, catécholamines, insuline, œstrogènes), neurotransmetteurs (acétylcholine, noradrénaline) et facteurs dérivés des plaquettes (thrombine, sérotonine, ADP). Deux voies de signalisation permettent l'activation de la eNOS, la voie calcium/calmoduline d'une part et la

voie PI3kinase/Akt d'autre part. L'activité de la eNOS est régulée par la phosphorylation d'un site activateur, sérine 1177 non phosphorylée au repos, et la déphosphorylation d'un site désactiveur, thréonine 495, constitutivement phosphorylée au repos, ce qui favorise la sensibilisation de la eNOS à la liaison calcium-calmoduline (Féléto, 2011). Il a été montré que l'inhibition de la phosphorylation du site activateur sérine 1177 par O-glycosylation contribuait à la diminution de formation de NO, observée dans le diabète (Matsumoto *et al.*, 2014). Le NO est un vasodilatateur puissant à la fois des vaisseaux de résistance et de conductance, il diffuse vers les cellules musculaires lisses vasculaires (CML) où il active la guanylyl cyclase soluble (GCs) en se liant à son hème ferreux, conduisant à la conversion du guanosine triphosphate (GTP) en guanosine monophosphate 3', 5' cyclique (cGMP) qui, à son tour, active la protéine kinase G et modifie le niveau de phosphorylation de nombreuses protéines cibles pour enfin diminuer la concentration de calcium cytosolique favorisant la relaxation. Le NO a également un effet inhibiteur direct sur l'activité de la Rho-kinase qui contrôle l'assemblage des filaments d'actine du cytosquelette et la contraction des CML (Sauzeau *et al.*, 2000 ; Sawada *et al.*, 2001).

### ***I-2 La prostacycline PGI<sub>2</sub>***

Les CE peuvent également induire dans certaines conditions, la libération de **la prostacycline** (PGI<sub>2</sub>), principal métabolite de l'acide arachidonique (AA). Historiquement, la PGI<sub>2</sub> est le premier EDRF découvert en 1976 (Moncada *et al.*, 1976). Elle est produite par les actions séquentielles de la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), de la cyclooxygénase-1 (COX-1) et de la prostacycline synthase (PGIS). La synthèse de la PGI<sub>2</sub> peut être stimulée par les forces de cisaillements, l'hypoxie, ou suite à l'activation de récepteurs membranaires par la bradykinine, la thrombine, et des facteurs de croissance. Cette synthèse dépend du calcium et peut être régulée par différentes voies de signalisation, telles que la phosphorylation par des protéines kinases ou la modification de certains facteurs de transcription. Par exemple, la liaison de la thrombine à son récepteur PAR-1 active les MAPK (*Mitogène Activated Protein Kinase*) ce qui provoque la phosphorylation de la sérine 505 et l'activation de la PLA<sub>2</sub> cytosolique, conduisant à une augmentation de la libération d'AA et à la synthèse rapide de PGI<sub>2</sub> par la COX-1. De plus, l'activation de PAR-1 et de PAR-2 augmente l'activité du facteur de transcription NF-κB, ce qui favorise l'expression de COX-2 inductible et conduit à une synthèse soutenue de PGI<sub>2</sub> (Wheeler-Jones, 2008). La PGI<sub>2</sub> agit principalement via le récepteur membranaire de la prostacycline (IP) afin de stimuler l'adénylyl cyclase soluble pour former l'adénosine monophosphate 3', 5' cyclique (AMPc) qui, à son tour, active la protéine kinase A,

ce qui entraîne une diminution de la concentration de calcium cytosolique et pourrait également provoquer une inhibition de la Rho kinase, entraînant une vasodilatation (cf. paragraphe p 10).

Dans les conditions physiologiques, les propriétés vasodilatatrices de la PGI<sub>2</sub> sont souvent masquées par celles du NO (Vanhoutte *et al.*, 2016). Cependant, dans des conditions pathologiques telles que le diabète, l'effet de la PGI<sub>2</sub> semble être prépondérant. En effet, la PGI<sub>2</sub> participe activement dans les relaxations induites par l'acétylcholine dans l'artère coronaire de chien diabétique (Gebremedhin *et al.*, 1988) et dans l'aorte de souris diabétique (Shen *et al.*, 2003). De plus, l'administration orale d'analogue de la prostacycline normalise la relaxation à l'acétylcholine dépendante de l'endothélium dans l'aorte de rats diabétiques (Matsumoto *et al.*, 2002)

### ***1-3 Le Facteur Hyperpolarisant Dérivé de l'Endothélium***

Outre le NO et la prostacycline, l'endothélium peut également induire la vasorelaxation par d'autres mécanismes provoquant une hyperpolarisation des CML. Cette caractéristique est à l'origine du terme « **Facteur Hyperpolarisant Dérivé de l'Endothélium** » (EDHF). L'hyperpolarisation des CML a pour conséquence de bloquer les canaux calciques dépendants du voltage, présents à la membrane des CML ou bien au niveau du réticulum sarcoplasmique, la diminution des concentrations calciques entraînant la vasorelaxation. La contribution de la composante EDHF s'accroît avec la réduction du calibre des artères. Ainsi, l'EDHF contrôle majoritairement le tonus des artères de résistance.

Il est intéressant de noter que, chez les souris double-knock-out eNOS/COX-1, la vasodilatation médiée par EDHF joue un rôle compensateur important dans la régulation de la pression artérielle *in vivo* (Écosse *et al.*, 2005). Cet effet compensateur est également observé chez les animaux diabétiques, où les relaxations médiées par l'EDHF sont augmentées lorsque la composante NO est réduite, et diminuées lorsque la composante NO est conservée (Triggle *et al.*, 2004).

L'EDHF peut être induit par divers agonistes tels que l'acétylcholine ou la bradykinine ou par l'ionophore calcique A23187 ou la thapsigargine (inhibiteur de la SERCA : sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase). Bien que sa nature suscite encore de nombreuses interrogations, son mécanisme d'action lui-même implique une augmentation de la concentration intracellulaire du calcium, suivie de l'ouverture des canaux potassiques calcium-dépendants de faible et de



moyenne conductance,  $SK_{Ca}$  et  $IK_{Ca}$  respectivement. L'activation des canaux  $SK_{Ca}$  induit l'hyperpolarisation des CML par transfert électrique direct à travers les jonctions myo-endothéliales, alors que l'activation des canaux  $IK_{Ca}$  provoque un efflux de potassium capable d'activer les canaux potassiques rectifiant entrant ( $Kir$ ) et/ou la pompe  $Na^+/K^+-ATPase$  du muscle lisse (Vanhoutte *et al.*, 2016).

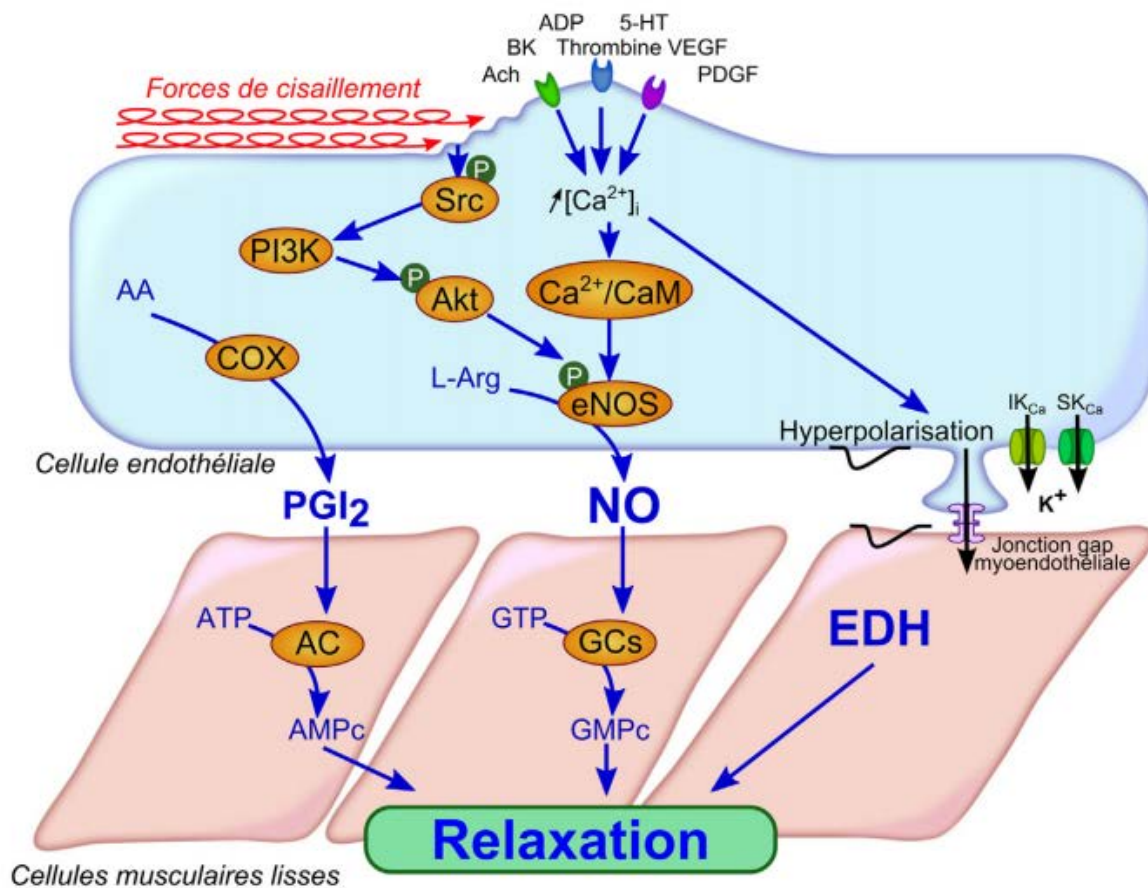


Figure 3 : Mécanismes de relaxation vasculaire dépendants de l'endothélium (Auger *et al.*, 2015)

## **II- L'endothélium limite le remodelage vasculaire**

Le remodelage vasculaire est un changement structurel des vaisseaux sanguins suite à la prolifération et la migration des CML et la surproduction de matrice extracellulaire. Il s'agit généralement d'un processus adaptatif en réponse à des changements chroniques des conditions hémodynamiques (HTA) ou à des facteurs humoraux comme l'Angiotensine II. Cependant, un remodelage vasculaire excessif peut contribuer à la pathogénèse de maladies vasculaires. L'endothélium est capable d'inhiber ce processus par l'intermédiaire du NO en partie, via un mécanisme GMPC dépendant (Garg *et al.*, 1989, Dzau *et al.*, 1993 ; Dubey *et al.*, 1995). Ainsi, le traitement de rats avec l'ester méthylique de la nitro-L-arginine (L-NAME), un inhibiteur de la eNOS, entraîne une augmentation soutenue de la pression systémique accompagnée d'un remodelage microvasculaire marqué (Numaguchi *et al.*, 1995). La co-administration de l'hydralazine (un vasodilatateur) a compensé les effets du L-NAME sur la pression artérielle, mais n'a pas modifié le remodelage vasculaire, suggérant que la pression artérielle élevée seule, ne peut expliquer le remodelage pathologique, et que le NO pourrait avoir un rôle dans le remodelage vasculaire via des actions non hémodynamiques. En effet, le NO prévient la migration et la prolifération des CML, et régule la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire, ainsi que l'expression génique de nombreux facteurs de croissance. Chez l'homme, l'administration de donneurs de NO réduit le développement d'un épaississement de l'intima après une angioplastie transluminale percutanée (étude ACCORD, 1997). De plus, des études *in vivo*, ont montré que le traitement avec des inhibiteurs de la eNOS, après une lésion par ballonnet ou une alimentation riche en cholestérol augmente la formation d'un néo-intima chez le lapin (Cayatte *et al.*, 1994. Guo *et al.*, 1994).

## **III- Endothélium et réponse hémostatique**

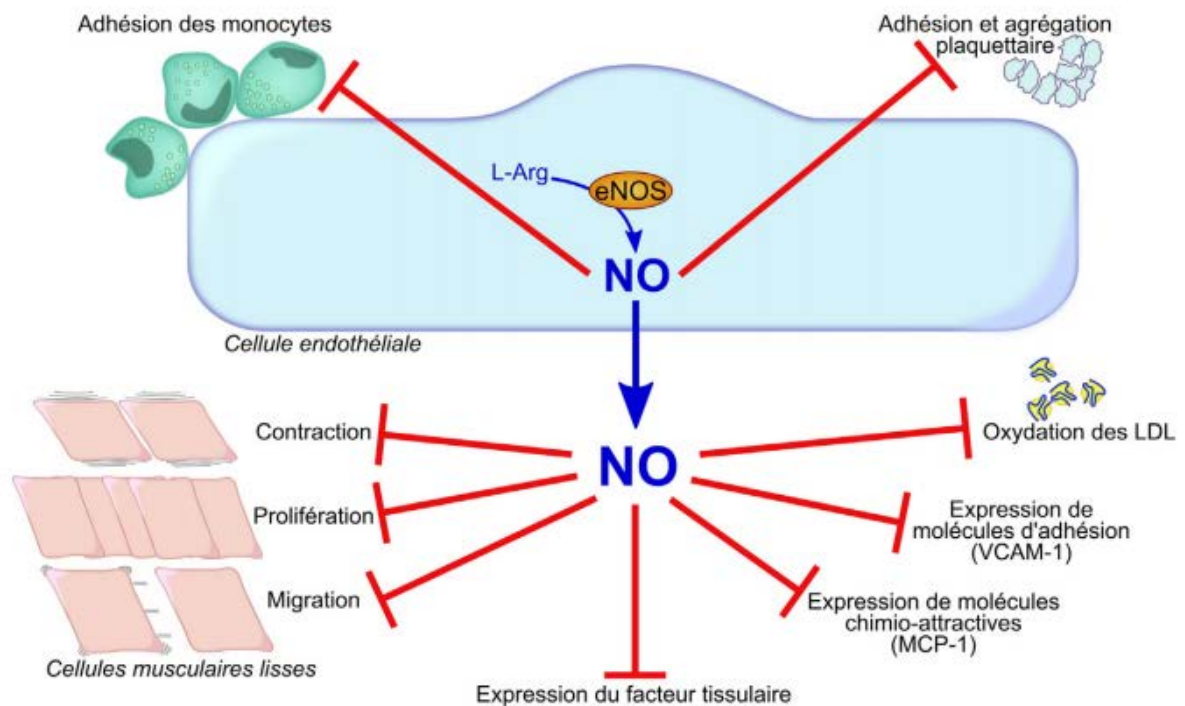
En situation physiologique, l'endothélium constitue une surface hémocompatible, limitant les réactions de coagulation et donc la thrombogénèse. En situation physiologique, la formation d'un caillot est localisée au site de la brèche vasculaire, là où le sous-endothélium dénudé et l'endothélium activé favorisent respectivement l'adhésion plaquettaire et l'activation des facteurs de la coagulation, qui circulent sous forme de zymogène, ont besoin de la surface catalytique de la membrane plasmique des cellules activées pour former les complexes d'activation de la cascade. L'ensemble favorise l'agrégation plaquettaire et la formation du clou plaquettaire s'insérant dans la paroi, et rapidement consolidé par un réseau de fibrine. En situation pathologique, l'hypercoagulabilité combinée à l'activation des cellules vasculaires,

notamment l'endothélium inflammatoire, catalyse la formation d'un thrombus dirigé vers la lumière du vaisseau. L'activation de la cascade de la coagulation et celle des cellules vasculaires sont prévenues par le NO et la PGI<sub>2</sub> (Radomski *et al.*, 1987). Le NO et la PGI<sub>2</sub> inhibent puissamment les fonctions plaquettaires suite à l'activation des Guanylyl Cyclases et des adénylyl cyclases associées à la libération de GMPc et AMPc respectivement. Ces nucléotides cycliques stimulent respectivement la protéine kinase dépendante du GMPc (protéine kinase G, PKG I) et la protéine kinase dépendante de l'AMPc (protéine kinase A, PKA I et PKAII) qui à leur tour, permettent la phosphorylation d'un large panel de protéines entraînant l'inactivation de petites protéines G des familles Ras et Rho, l'inhibition de la libération de Ca<sup>2+</sup> des réserves intracellulaires et la modulation de la dynamique des filaments d'actine du cytosquelette (Smolenski *et al.*, 2012). Les inhibiteurs des phosphodiesterases (dipyridamole, cilostazol) impliquées dans la dégradation du GMPc et de l'AMPc, constituent une classe de médicaments antiagrégants plaquettaires. Cependant la signalisation des nucléotides cycliques n'est pas la seule responsable de l'effet antiagrégant plaquettaire du NO et de la PGI<sub>2</sub>. En effet, le traitement par 8 bromo-GMPc, un analogue structurel de la GMPc, induit une inhibition partielle de l'agrégation plaquettaire (Mellion *et al.*, 1983). Le S-nitroso-N-acétylcystéine, un donneur de NO, inhibe la liaison du fibrinogène aux plaquettes et diminue l'exposition de la P-sélectine transloquée du réseau canaliculaire vers la surface plaquettaire et favorisant l'interaction plaquettes-leucocytes-endothélium par l'intermédiaire d'un contre ligand, le PSLG-1 (Salas *et al.*, 1994). En ce qui concerne la cascade de la coagulation, le NO inhibe l'expression du facteur tissulaire, initiateur cellulaire de la cascade de coagulation induit à la surface de l'endothélium et des monocytes activés. Le NO augmente la synthèse de sulfate d'héparane, qui catalyse l'inhibition de la thrombine par l'antithrombine. Enfin, l'endothélium favorise la fibrinolyse grâce à la libération de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) et de l'urokinase qui, en convertissant le plasminogène en plasmine, capable de dégrader la fibrine et de favoriser la dissolution du caillot sanguin (Aird *et al.*, 2005). La fibrine dégradée constitue un support pro-angiogénique et favorise la cicatrisation.

#### IV- L'endothélium s'oppose aux processus d'athérogènese

Le recrutement des monocytes dans la paroi vasculaire et leur migration trans-endothéliale est l'un des premiers événements du processus d'athérosclérose. Les monocytes sont attirés dans l'intima par chimiotactisme grâce à la MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), une chimiokine libérée par les CEs après activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B en réponse à des stimuli tels que l'endothéline. Leur recrutement est médié par des molécules d'adhésion cellulaire exprimées sur les CEs et sur les leucocytes circulants, en réponse à de nombreux stimuli inflammatoires. L'adhésion commence par le roulement des leucocytes sur la surface endothéliale (Rolling) grâce à la ligature de la E-sélectine, tandis que l'adhérence dépend des interactions entre des molécules de type immunoglobuline, telles que la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1) et la molécule d'adhésion aux cellules vasculaire-1 (VCAM-1). Les monocytes recrutées se différencient en macrophages, qui ont un rôle important dans le processus d'athérosclérose en stimulant la production de cytokines, de protéases et de radicaux libres dérivés de l'oxygène. L'expression génique des molécules d'adhésion endothéliale est sous le contrôle du facteur de transcription nucléaire NF- $\kappa$ B.

Le NO possède des propriétés anti-inflammatoires et anti athérosclérotiques essentiellement en inhibant l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B (Harrison *et al.*, 2000). En effet, Il a été montré que le traitement des CEs par un donneur de NO, le nitroprussiate de sodium (SNP) prévient la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B après stimulation par le facteur tumoral de nécrose- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), le mécanisme proposé impliquait à la fois une stabilisation et une transcription accrue du gène I $\kappa$ B permettant la séquestration de NF- $\kappa$ B dans le cytosol (Peng *et al.*, 1995). Une autre étude indique que les donneurs de NO inhibent directement la liaison de NF- $\kappa$ B à l'ADN en modifiant, par S-nitrosylation, le résidu cystéine 62 de la sous unité p50 de NF- $\kappa$ B (James *et al.*, 1996).



**Figure 4 : Mécanismes protecteurs de l'homéostasie vasculaire dépendants de l'endothélium (Auger *et al.*, 2015)**

Ainsi, l'endothélium est un régulateur majeur de l'homéostasie vasculaire. La moindre perturbation de son fonctionnement entraîne la dysfonction endothéliale. Lorsque les CEs deviennent dysfonctionnelles, avec le vieillissement, l'hypertension ou le diabète en particulier, le rôle protecteur du NO endothélial est réduit, ce qui favorise la vasoconstriction, la thrombose, la transmigration des monocytes, la prolifération des CML et la réaction inflammatoire menant à l'athérosclérose.

## Chapitre 2 : La dysfonction endothéliale

### I- La dysfonction endothéliale, un élément central des pathologies vasculaires

La dysfonction endothéliale est un état pathologique de l'endothélium, caractérisée par l'altération des relaxations dépendantes de l'endothélium dans les artères isolées d'une part, et une moindre vasodilatation *in vivo*, chez l'homme et l'animal, d'autre part (Verbeuren *et al.*, 1986 ; Creager *et al.*, 1990 ; Panza *et al.*, 1997). La preuve initiale de l'existence de la dysfonction endothéliale chez l'homme a été apportée par Ludmer *et al.*, en 1986. Des concentrations d'acétylcholine ou de nitroglycérine (donneur de NO) ont été perfusées dans l'artère coronaire de patients présentant une athérosclérose coronaire avancée (rétrécissement supérieur à 50%), ou légère (rétrécissement de moins de 20%), comparé aux sujets présentant des artères coronaires angiographiquement normales. Les réponses vasculaires ont été évaluées par angiographie quantitative. L'acétylcholine a provoqué une dilatation dose-dépendante des artères coronaires normales. En revanche, les artères coronaires athéromateuses présentaient une constriction dose-dépendante en réponse à l'acétylcholine, montrant pour la première fois l'existence d'une dysfonction endothéliale dans l'athérosclérose coronarienne (Ludmer *et al.*, 1986).

#### *I-1 Mécanismes impliqués dans la dysfonction endothéliale*

##### *I-1.1 La perte des facteurs vasodilatateurs.*

Un déficit de la production et/ou de l'action du NO a été impliqué dans plusieurs états pathologiques telles que l'hypertension (Baylis *et al.*, 1992 ; Arnal *et al.*, 1992), et l'athérosclérose (Tiefenbacher *et al.*, 2000). Expérimentalement, l'administration chronique de L-NAME, un inhibiteur de la eNOS, réduit de 60% les relaxations dépendantes de l'endothélium à l'acétylcholine mesurées *ex vivo* dans l'aorte de rats et induit une hypertension artérielle systémique soutenue (Gardiner *et al.*, 1992 ; Küngf *et al.*, 1995).

L'altération de la signalisation EDH peut aussi contribuer à la dysfonction endothéliale dans certaines pathologies cardiovasculaires. Par exemple, un défaut dans les connexines qui composent les jonctions myo-endothéliales est en partie responsable d'une l'altération de la dilatation dépendante de l'endothélium observée en réponse à l'acétylcholine chez les rats hypertendus (Rummary *et al.*, 2004) et chez les rats diabétiques (Young *et al.*, 2008).

### *I-1.2 L'augmentation des facteurs vasoconstricteurs endothéliaux.*

Les CEs peuvent induire une contraction des CML sous-jacentes en libérant des facteurs de contraction dérivés de l'endothélium (EDCF). De nombreuses études confirment que la plupart de ces réponses sont souvent dues à la formation de prostanoïdes vasoconstricteurs (endoperoxydes et PGI<sub>2</sub>). Ces contractions dépendantes de l'endothélium sont prévenues par les inhibiteurs non sélectifs de COX (Vanhoutte *et al.*, 1985), démontrant leur rôle clé. En effet, les COXs, sont les principales enzymes de la synthèse des prostanoïdes.

Il existe deux isoformes de COX, La COX-1, constitutive, exprimée par la plupart des types cellulaires, alors que la COX-2 est inductible, son expression étant régulée par des médiateurs inflammatoires tels que l'IL-1 $\beta$  via le facteur de transcription NF- $\kappa$ B ou la signalisation des MAPK (Cipollone *et al.*, 2008 ; Kawabe *et al.*, 2010 ). L'AA est transformé par la COX-1 en endoperoxydes (PGH<sub>2</sub>), capables eux-mêmes d'induire une contraction, ou servant de précurseurs aux différents prostanoïdes vasoconstricteurs. Les PGH<sub>2</sub> sont converties en prostacycline, thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), prostaglandines PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> par leurs synthèses respectives.

Les quantités et localisations subcellulaires des différentes synthèses pourraient orienter vers la formation d'un prostanoïde plutôt qu'un autre. L'expression de la prostacycline synthase est abondante dans les CEs. Ainsi, la libération de prostacycline l'emporte sur celle des autres prostaglandines. Cependant et de manière inattendue, dans certains lits vasculaires, la PGI<sub>2</sub> en excès, est capable d'induire non pas une relaxation médiée par le récepteur de la PGI<sub>2</sub> (IP), mais une contraction des CML en se liant au récepteur du thromboxane (TP), comme si bien exprimé par Paul Vanhoutte : « *when a good guy turns bad* ». Ces contractions sont inhibées par les antagonistes des récepteurs TP. Enfin, l'action antiproliférative de la PGI<sub>2</sub> sur les CML médiée par les récepteurs IP, pourrait être contrebalancée par une réponse angiogénique médiée par PPAR $\delta$  (Wise *et al.*, 2003 ; Helliwell *et al.*, 2004b).

De plus, outre son effet vasoconstricteur propre, le TXA<sub>2</sub> peut réduire les relaxations médiées par l'EDH en inhibant directement l'hyperpolarisation des ECs et/ou des CML médiée par l'ouverture des canaux potassiques calcium-dépendants, ainsi que les voies de signalisation médiées par les jonctions gap (Ellinsworth *et al.*, 2014).

L'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca<sup>2+</sup> est le facteur déclenchant initial des contractions dépendantes de l'endothélium (Tang *et al.*, 2007). En effet, les contractions

dépendantes de l'endothélium sont réduites lorsque la concentration extracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  est faible et peuvent être provoquées par l'ionophore calcique A23187 (Tang *et al.*, 2007). Les concentrations calciques intracellulaires activent la phospholipase  $A_2$ , rendant disponible l'AA pour le métabolisme des COXs.

D'autres molécules comme les peptides vasoactifs tels que l'angiotensine II (Ang II) et l'endotheline-1 (ET-1) peuvent également contribuer à la dysfonction endothéliale. En effet, l'ET-1 est un vasoconstricteur endogène puissant (Barton *et al.*, 2012), principalement sécrété par les CEs. Les récepteurs ET A présents dans les CML, induisent une vasoconstriction, et sont responsables des effets prolifératifs, pro-inflammatoires et pro-oxydant de l'ET-1, alors que les récepteurs ET B présents dans les CEs, les contrecarrent (Yeager *et al.*, 2012). Des niveaux sanguins élevés d'ET-1 sont observés dans l'athérosclérose (Lerman *et al.*, 1991), l'hypertension pulmonaire (Stewart *et al.*, 1991) et l'insuffisance cardiaque (Choussat *et al.*, 1998. Stewart *et al.*, 1992) suggérant un rôle dans le développement de la dysfonction endothéliale dans ces circonstances. Ainsi, les antagonistes des récepteurs ET améliorent les relaxations dépendantes de l'endothélium dans l'artère basilaire de rat diabétique (Abdelsaid *et al.*, 2014) et celle des patients atteints de diabète de type 2 et de maladies coronariennes évaluée par plethysmographie (Rafnsson *et al.*, 2014).

Enfin, le NO lui-même, sous certaines conditions telle que l'hypoxie, peut provoquer une activation biaisée de la GCs conduisant à la production de monophosphate d'inosine cyclique (IMPC) plutôt que du GMPc entraînant donc une contraction plutôt qu'une relaxation des CML (Gao *et al.*, 2015).



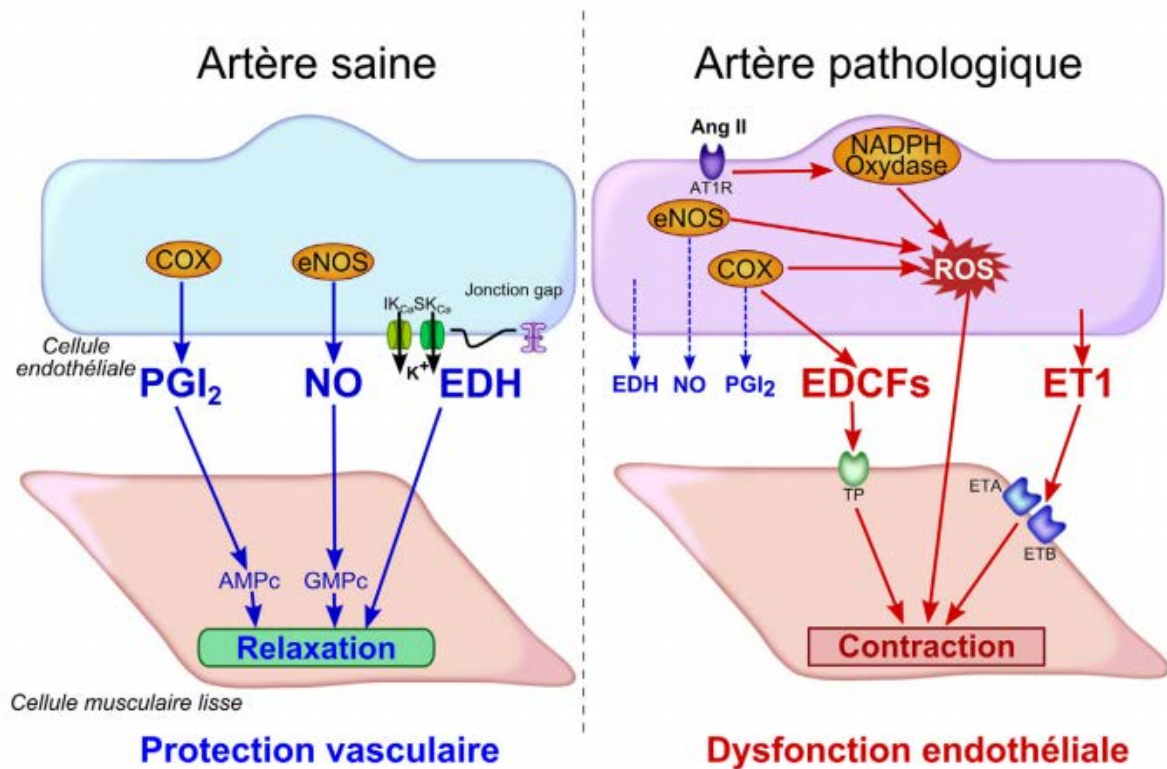


Figure 5 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la dysfonction endothéliale (Auger *et al.*, 2015)

### *I-2 Conditions physiopathologiques associées à la dysfonction endothéliale*

De nombreuses études ont montré que la dysfonction endothéliale, associée à une perte des propriétés vasoprotectrices de l'endothélium, contribue à la pathogenèse des maladies cardiovasculaires et qu'elle précède le développement de l'athérosclérose (Widlansky *et al.*, 2003 ; Celermajer *et al.*, 1992).

#### *I-2.1 La dysfonction endothéliale liée aux facteurs de risque cardiovasculaire*

La dysfonction endothéliale est associée à la plupart des facteurs de risque cardiovasculaires tels que l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie, le tabagisme et le diabète. Les souris transgéniques homozygotes pour l'inactivation du gène de la eNOS développent une hypertension, une hyperlipidémie et une résistance à l'insuline, comparées aux souris de type sauvage (Duplain *et al.*, 2001).

Une relation de causalité entre la dysfonction endothéliale et les événements cardiovasculaires a été suggérée par plusieurs études cliniques. Halcox et ses collègues ont analysé la fonction endothéliale de 308 patients coronariens par FMD (Flow Mediated Dilatation). Après une période de 46 mois de suivi, ils ont identifié un total de 35 événements cardiovasculaires (infarctus du myocarde (IDM), accident vasculaire cérébral (AVC)). Ces événements ont été associés à une altération de la vasorelaxation dépendante de l'endothélium chez ces patients. De même, la dysfonction endothéliale mesurée par FMD a été associée à un risque CV accru chez les patients présentant des facteurs de risque CV connus (Perticone *et al.*, 2001).

Il a également été montré que la dysfonction endothéliale macrovasculaire (Yeboah *et al.*, 2009) et microvasculaire (Anderson *et al.*, 2011) avait une valeur prédictive indépendante de risque primaire CV dans de grandes études de cohorte chez des sujets sains sans facteurs de risque. L'étude prospective MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis), qui a examiné sur une période de suivi de 5 ans, l'association entre la FMD et les événements cardiovasculaires (IDM incident, angine définie, revascularisation coronaire, AVC, arrêt cardiaque ressuscité et décès d'origine CV), dans une cohorte de 6814 sujets sans maladie cardiovasculaire connue, a montré que la FMD brachiale était significativement et inversement associée aux événements cardiovasculaires incidents, indépendamment des autres facteurs de risque cardiovasculaire majeurs (HR, 0,79; IC 95%, 0,65 à 0,97; P = 0,01).

Ainsi, la valeur de la FMD brachiale qui reflète la dysfonction endothéliale, est prédictive des événements cardiovasculaires et a même amélioré la classification des sujets comme à risque CVD faible, intermédiaire ou élevé par rapport à l'indice de Framingham (Framingham Risk Score) (Yeboah *et al.*, 2009). Ces données fournissent des preuves supplémentaires appuyant le rôle clé de la dysfonction endothéliale dans la pathogenèse des maladies cardiovasculaires.

### *I-2.2 La dysfonction endothéliale liée à l'âge*

La dysfonction endothéliale apparaît également au cours du vieillissement physiologique. La vasodilatation induite par le flux, qui est un indicateur de l'état de santé de l'endothélium, diminue progressivement chez l'homme après 50 ans (Taddei *et al.*, 2001). Les études épidémiologiques ont identifié l'âge comme le principal facteur de risque de morbi-mortalité cardiovasculaire (Lakatta et Levy, 2003a ; Shih *et al.*, 2011). Irréversible, le vieillissement se caractérise par un changement graduel de la structure et de la fonction vasculaire entraînant une dysfonction des CE et des CML.

Les CML âgées acquièrent un phénotype prolifératif, migratoire et sécrétoire. L'épaisseur de la paroi vasculaire augmente de deux à trois fois entre 20 et 90 ans et la média présente une augmentation accrue du contenu en collagène et élastine, ce qui augmente les résistances vasculaires et le risque d'athérosclérose (Nagai *et al.*, 1998 ; Lakatta et Levy, 2003b). Une méta-analyse a montré qu'une augmentation de 0,1 mm de l'épaisseur intima-media (IMT) de l'artère carotide (un marqueur de maladie vasculaire utilisé en clinique) est associée à une augmentation de 18% du risque d'AVC et de 15% du risque d'infarctus du myocarde (Lorenz *et al.*, 2007).

Les CE âgées présentent une faible expression de la eNOS et une diminution de la production du NO, accompagnées d'une formation accrue de ROS et de molécules pro-inflammatoires, de prostanoïdes vasoconstricteurs et d'endothéline-1 (Sato *et al.*, 1993 ; Minamino *et al.*, 2002). Les CE isolées de donneurs âgés présentent une diminution de la synthèse du NO en réponse aux stimuli mécaniques ou aux agonistes, accompagnée par une sensibilité accrue aux stimuli apoptotiques (Asai *et al.*, 2000 ; Hoffmann *et al.*, 2001 ; Matz *et al.*, 2000). La perte de la phosphorylation de la eNOS dépendante de la voie PI3K/Akt semble être le mécanisme principal expliquant la réduction de la production de NO dans les aortes de rats âgés (Smith *et al.*, 2003).

Les vaisseaux âgés montrent une relaxation endothélium dépendante altérée. Ceci a été observé dans différents lits vasculaires, comme l'artère mésentérique de rat et l'artère brachiale chez l'homme, et implique une réduction des deux composantes NO et EDH, et est souvent associée à une augmentation des réponses EDCF impliquant les COXs (Vanhoutte *et al.*, 2008). Une diminution de l'expression des canaux potassiques calcium dépendants a également été observée dans les artères coronaires de rat âgées (Marijic *et al.*, 2001 ; Herrera *et al.*, 2010).

## II- Le stress oxydant à l'origine de la dysfonction endothéliale

De nombreuses études ont montré que le stress oxydant est un facteur clé dans l'initiation et le développement de la dysfonction endothéliale. La consommation d'un mélange antioxydant comprenant la vitamine C (1000 mg), la vitamine E (600 UI), et de l'acide  $\alpha$ -lipoïque (600 mg) restaure la fonction endothéliale évaluée par FMD chez des sujets âgés sans affecter celle des sujets jeunes (Taddei *et al.*, 2001; Wray *et al.*, 2012). De même, la vitamine C rétablit la vasodilatation médiée par le flux chez les patients hypertendus (Taddei *et al.*, 1998), et chez les patients atteints de diabète type2 (Ting *et al.*, 1996).

### II-1 mécanismes du stress oxydant

Le stress oxydant est caractérisé par une génération excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), tels que l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle et le peroxydinitrite. Les ROS sont de petites molécules hautement réactives en raison de la présence d'électrons non appariés sur leur couche externe. Elles sont générées dans la cellule sous forme de sous-produits de plusieurs voies métaboliques et enzymatiques. Les mitochondries jouent un rôle clé dans la production, car la majorité des ROS cellulaires sont générées durant la phosphorylation oxydative, un processus mitochondrial durant lequel les électrons sont extraits du NADH et de la FADH puis transférés à l'oxygène moléculaire par une chaîne de 4 complexes enzymatiques assurant la phosphorylation de l'ADP en ATP et la réduction de l'oxygène moléculaire en eau. Ces électrons peuvent réagir directement avec des accepteurs d'oxygène pour générer des ROS.

Il a été suggéré que moins de 2% de la consommation totale d'oxygène est détournée pour la génération de ROS (Chance *et al.*, 1979). De faibles concentrations de ROS sont nécessaires au bon fonctionnement cellulaires (Nemoto *et al.*, 2000 ; Werner et Werb, 2002 ; Dada *et al.*, 2003). Produites en excès, les ROS interagissent avec un grand nombre de molécules: des protéines, des lipides, des polysaccharides et des acides nucléiques, ce qui peut altérer irréversiblement la fonction de la molécule cible et perturber ainsi la réponse cellulaire.

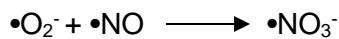
La production de ROS est souvent auto-amplifiée par le biais de cercles vicieux. Par exemple, les ROS libérées durant le processus respiratoire, endommagent l'ADN mitochondrial, qui, contrairement à l'ADN nucléaire, ne dispose pas de mécanisme de réparation. Les mutations ainsi induites au niveau du génome mitochondrial provoquent des anomalies fonctionnelles de

la chaîne respiratoire favorisant une production excessive de ROS (Miquel *et al.*, 1998). De plus, l'anion superoxyde peut subir une réaction de dismutation pour générer du peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bienert *et al.*, 2006). Ce dernier ne possédant pas d'électrons non appariés, est plus stable que l'anion superoxyde. Il diffuse partout dans la cellule et donne naissance, via des réactions de type « Fenton », au plus délétère des ROS, le radical hydroxyle (•OH) (Valko *et al.*, 2007).



## II-2 Stress oxydant et physiopathologie vasculaire

Au niveau vasculaire, l'anion superoxyde diminue la biodisponibilité du NO empêchant ainsi la vasodilatation. En effet, l'anion superoxyde interagit chimiquement avec le NO pour former le peroxynitrite (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>).



De plus, ce dernier est un puissant agent pro-oxydant, qui aggrave les lésions vasculaires via l'oxydation des groupements sulfhydryles, et la nitration et l'hydroxylation des groupements aromatiques tels que la tyrosine, le tryptophane et la guanine (Féléto et Vanhoutte, 2006). Par exemple la nitration de la prostacycline synthase (PGIS) par le peroxynitrite réduit la production de PGI<sub>2</sub>, tandis que la thromboxane synthase n'est pas affectée, ce qui favorise la production de TXA<sub>2</sub> (Wu et Liou, 2005 ; Zou *et al.*, 2007). En outre, le peroxynitrite **découple la eNOS** en oxydant son cofacteur, le BH<sub>4</sub>. Une fois découplée, la eNOS produit des ROS au lieu du NO (cf. paragraphe p 3). Les ROS peuvent également **affecter le facteur EDH** car ils altèrent l'activité des canaux potassiques calcium dépendant

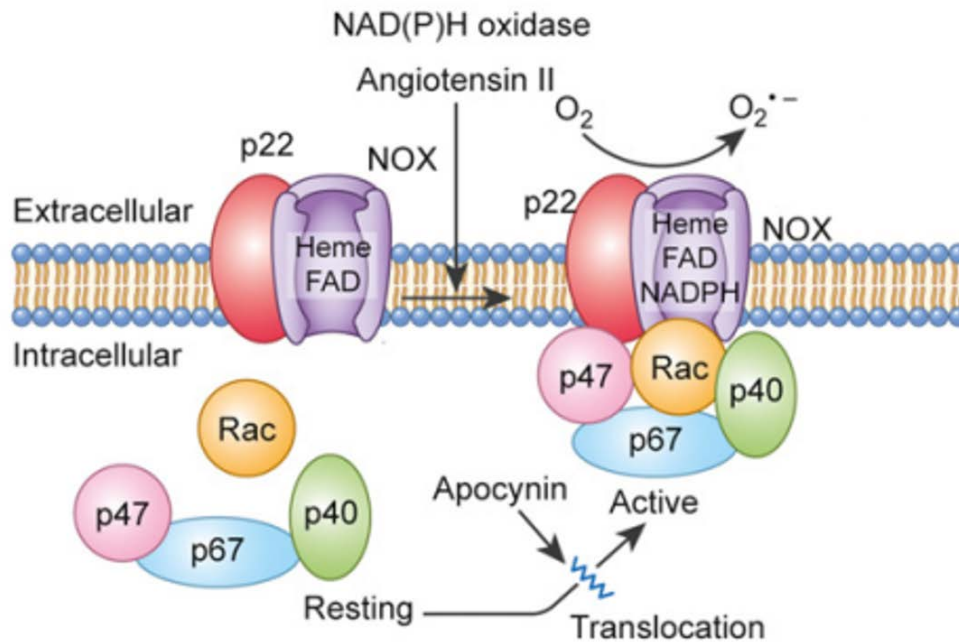
Il faut également noter que le stress oxydant affecte les cellules vasculaires circulantes et pariétales et est un élément clé de la pathogenèse de **l'athérosclérose**. En effet, les ROS produites par cellules musculaires lisses, cellules endothéliales ou les macrophages favorisent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL), l'internalisation des LDL oxydés par les monocytes/macrophages infiltrés dans la paroi artérielle forment les cellules spumeuses (foam cell), caractéristiques des plaques d'athérome (Gerrity 1981; Steinberg ; Parthasarathy *et al.*, 1989). De plus, les LDL oxydés activent les leucocytes qui secrètent des cytokines pro-inflammatoires (IL-18, IFN-γ) contribuant à la progression des plaques athéromateuses (Stemme, Faber *et al.*, 1995; Packard et Libby 2008).

### II-3 Sources enzymatiques des ROS

Dans la paroi vasculaire, les ROS sont produits par différentes enzymes telles que les cyclooxygénases, la NADPH oxydase, la xanthine oxydase, la chaîne respiratoire mitochondriale, et par la eNOS découplée.

**Les cyclooxygénases (COXs) :** L'activité des COXs implique deux réactions, une réaction de cyclooxygénation dans laquelle l'AA lie deux molécules d'oxygène pour former le PGG<sub>2</sub> et une réaction de peroxydation dans laquelle PGG<sub>2</sub> est réduite par deux électrons pour former PGH<sub>2</sub> (Smith *et al.*, 2000 ; Arehart *et al.*, 2007). Cette réaction est souvent associée à la formation d'anions superoxyde en tant que sous-produits de l'activité peroxydase des COXs (McCullough *et al.*, 2004). De plus, un cercle vicieux se crée dans lequel l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> provoque la peroxydation des lipides membranaires, et les peroxydes lipidiques, à leur tour, augmentent l'activité des COXs, la production de PGH<sub>2</sub> et la formation de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Davidge *et al.*, 2001). La production accrue de ROS observée tout au long de la paroi des artères âgées est associée à une augmentation des réponses contractiles dépendantes de l'endothélium suite à une surexpression des COXs (Vanhoutte *et al.*, 2008; Félétou *et al.*, 2006).

**La NADPH oxydase :** Elle est la principale source de ROS dans la paroi vasculaire pathologique. Pendant longtemps, la génération d'anion superoxyde par la NADPH oxydase a été considérée comme restreinte aux cellules phagocytaires responsables de la défense de l'hôte. Puis, de nombreuses études ont montré sa présence dans la paroi vasculaire et son implication dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires (Griendling *et al.*, 2000). La NADPH oxydase est une enzyme capable de transférer les électrons à travers la membrane plasmique afin de réduire l'oxygène en anion superoxyde et de générer d'autres espèces réactives de l'oxygène en aval. Elle est composée d'un complexe de sous-unités cytosoliques (p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>) et de sous-unités membranaires (p22<sup>phox</sup> et gp91<sup>phox</sup> ou un autre homologue NOX) et de petites protéines de liaison GTPases Rac.



**Figure 6 : Mécanismes de production de ROS par la NADPH oxydase (Vanhoutte *et al.*, 2016)**

Les mécanismes d'activation de la NADPH oxydase sont médiés par plusieurs voies. Chez l'animal, l'expression de p22<sup>phox</sup> dans la paroi vasculaire, augmente dans l'hypertension génétique, ou induite par Ang II ou par l'acétate de désoxycorticostérone (DOCA) (Zalba *et al.*; 2001), dans le diabète induit par la streptozotocine (Etoh *et al.*, 2003), et dans les vaisseaux de rat âgés (Idris Khodja *et al.*, 2012). Chez l'homme, une augmentation des niveaux d'expression de p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup> et NOX2 a été retrouvée dans les artères mammaires internes de patients atteints de maladies coronariennes et de diabète (Guzik *et al.*, 2000).

L'activation de la NADPH oxydase par l'Ang II est l'une des principales voies de production de ROS dans l'athérosclérose (Griendling *et al.*, 2000). Il est bien établi dans la littérature, que les formes d'hypertension induites par l'Ang II, ont un effet vasculaire unique non partagé avec les formes d'hypertension induites par d'autres vasoconstricteurs tels que la noradrénaline, qui est l'augmentation de la production vasculaire de ROS via l'activation de la NADPH oxydase, ceci est associée à une diminution drastique de la relaxation dépendante de l'endothélium à l'acétylcholine (Rajagopalan *et al.*, 1996). Des souris KO pour la sous-unité p47<sup>phox</sup> développent nettement moins d'HTA après infusion d'Ang II (122 mmHg après Ang II vs 105 mmHg avant Ang II), sans augmentation de production de ROS, comparées aux souris de type sauvage (155

mmHg vs 105 mmHg) (Landmesser *et al.*, 2002), suggérant un rôle important du stress oxydant produit par la NADPH oxydase en réponse à l'Ang II dans cette pathologie.

Les inhibiteurs du système rénine-angiotensine (RAS) empêchent l'augmentation de l'expression de l'ARNm des p22<sup>phox</sup> et NOX2 dans l'hypertension artérielle induite par Ang II chez le rat. De plus l'inhibition du RAS améliore la fonction endothéliale dans différents modèles animaux grâce à une diminution de l'activité de la NADPH oxydase (cf. ci-dessous).

#### II-4 Rôle du système angiotensine dans la dysfonction endothéliale

La vision initiale du système rénine-angiotensine (RAS) attribuait à l'Ang II un rôle d'hormone impliquée dans le contrôle de la pression artérielle, à travers la régulation hydro-sodique au niveau rénal, du tonus vasculaire, et du système nerveux central.

Ce rôle physiologique était décrit comme un système endocrine d'action uniquement plasmatique. Cependant, Il est désormais établi qu'il existe également un RAS tissulaire exerçant des actions autocrines et paracrines à l'état physiologique ou lors de pathologies (Lavoie *et al.*, 2003). Les études cliniques portant sur les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'Ang II (IEC) et les antagonistes des récepteurs AT-1 de l'Ang II (Sartans) ont montré une diminution de l'incidence des AVC, du diabète et des maladies rénales (Yusuf *et al.*, 2000 ; Dahlof *et al.*, 2002). Ces molécules semblent avoir des avantages au-delà de la réduction de la pression artérielle. Les essais cliniques suggèrent que plusieurs des effets bénéfiques de ces médicaments (IEC et Sartans) sont médiés par l'inhibition des effets de l'Ang II sur l'endothélium vasculaire.

Dans le plasma, l'angiotensinogène circulant est clivé par la rénine, une enzyme également plasmatique, en angiotensine I biologiquement inactive. Dans les tissus, la rénine est retenue par ces récepteurs. Cette fixation à la surface cellulaire est capitale dans le fonctionnement du RAS tissulaire permettant une production locale d'Ang II, indépendante du pool plasmatique (Nguyen *et al.*, 2002). L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), une métallo-enzyme, convertit l'angiotensine I inactive en Ang II active. Ainsi, l'activité du RAS tissulaire dépend à la fois de la présence des récepteurs de la rénine, de l'expression de l'enzyme de conversion ACE au sein du tissu concerné et de la présence d'angiotensinogène.



Les cellules endothéliales possèdent la machinerie enzymatique nécessaire à la production de l'Ang II : Elles expriment le récepteur de la rénine, l'enzyme ACE ainsi que les récepteurs AT-1 et AT-2 de l'Ang II. Bien que l'Ang II provoque à la fois une vasoconstriction via les récepteurs AT-1 et une vasorelaxation en stimulant les récepteurs AT-2, la vasoconstriction induite par l'Ang II est prédominante dans de nombreuses circonstances. Cependant, l'activation des récepteurs AT-2 en réponse à l'Ang II peut contribuer au remodelage vasculaire. En effet, l'administration chronique d'un antagoniste des récepteurs AT2 chez des rats rendus hypertendus par administration d'Ang II, n'a eu aucun effet sur la pression artérielle, mais a inhibé l'hypertrophie et la fibrose artérielle induites par l'Ang II (Levy *et al.*, 1996).

## II-5 Conséquences de l'activation du système RAS dans les vaisseaux

Les mécanismes par lesquels l'Ang II affecte la fonction vasculaire sont multiples. L'Ang II a des effets pro-oxydants, hypertrophiques, pro-inflammatoires et pro-fibrotiques qui ont été mis en évidence dans des modèles animaux ou cellulaires après perfusion/exposition à l'Ang II (Damy *et al.*, 2007).

L'Ang II a été identifiée comme un médiateur majeur du **stress oxydant** vasculaire via l'activation de la NADPH oxydase (Griendling *et al.*, 2002). En effet, l'Ang II à travers le récepteur AT-1 induit une dysfonction endothéliale en affectant à la fois la composante du NO et de l'EDH, chez des rats hypertendus et des rats cirrhotiques (Büssemaker *et al.*, 2003; Dal-Ros *et al.*, 2012). Plusieurs études *in vivo* ont montré des effets trophiques de l'Ang II sur les CML. Ainsi, la perfusion d'Ang II, chez des rats ayant subi une angioplastie artérielle avec une sonde ou ballonnet, augmente la prolifération néointimale (Daemen *et al.*, 1991).

Dans les CEs, l'Ang II favorise l'**athérothrombose** en augmentant l'expression endothéliale de PAI-1, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (Ridker *et al.*, 1993), et l'expression des récepteurs des LDL oxydés (Li *et al.*, 1999). L'Ang II induit également l'expression du récepteur du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et des métalloprotéinases matricielles (MMP), ce qui favorise le **remodelage vasculaire** (Watanabe *et al.*, 2005; Arenas *et al.*, 2004). L'Ang II favorise l'**inflammation** en induisant l'expression de COX2 et la libération de prostaglandines telles que le leucotriène C4, la prostaglandine E2, la prostaglandine I2 (Tamarat *et al.*, 2002), et en augmentant la perméabilité de l'endothélium, favorisant ainsi l'infiltration des cellules inflammatoires (Suzuki *et al.*, 2003).

Toutes les actions de l'Ang II décrites ci-dessus induisent la dysfonction endothéliale lorsque le système rénine-angiotensine est activé, comme c'est le cas dans l'athérombose (Warnholtz *et al.*, 1999) mais aussi au cours du vieillissement physiologique.

Plusieurs preuves suggèrent que l'Ang II contribue à la dysfonction endothéliale liée à l'âge. Une preuve directe par invalidation du gène codant pour AT1R, montre que les souris âgées déficientes en récepteurs AT1 ne montrent pas d'altération de la relaxation dépendante de l'endothélium dans l'artère basilaire, alors qu'elle est réduite de 50% chez les souris de type sauvage du même âge (Modrick *et al.*, 2009). De plus, la suppression du récepteur AT1 par knock out, prolonge la durée de vie et réduit le stress oxydant dans le cœur, l'aorte et les reins de souris âgées (Bénigne *et al.*, 2009).

L'inhibition de la production et de l'activité de l'Ang II par les IECs et les Sartans, respectivement, réduit la dysfonction endothéliale liées à l'âge *in vivo* (Dzau *et al.*, 2001; Kansui *et al.*, 2002; Mukai *et al.*, 2002). De plus, les Sartans, ainsi que les IEC ont montré des effets protecteurs contre les pathologies cardiovasculaires liées à l'âge chez l'homme (Oparil, 2002) et le rongeur (Gonzalez *et al.*, 2000 ; Bosc *et al.*, 2001). Des mécanismes impliquant une protection endothéliale ont été suggérés. Les IECs augmentent l'expression de l'eNOS et la production de NO dans l'aorte de rats normotendus, vraisemblablement via l'accumulation de bradykinine, étant donné que l'ACE intervient également dans l'inactivation de la bradykinine (Bachetti *et al.*, 2001).

Plusieurs groupes ont rapporté que la dysfonction endothéliale observée dans les vaisseaux sanguins est associée à l'apparition d'un phénotype de sénescence. Taddei *et al.*, avaient démontré que les altérations de la vasodilatation dépendante de l'endothélium dans l'hypertension artérielle, représentent une sorte d'accélération des changements observés avec le vieillissement (Taddei *et al.*, 2001). La dysfonction endothéliale associée aux vieillissement est également retrouvée chez des patients plus jeunes, atteints de maladies cardiovasculaires (Cohen *et al.*, 1995). Il a été postulé qu'un commutateur commun existe entre la dysfonction endothéliale observée dans les maladies cardiovasculaires et celle liée au vieillissement, déterminé comme étant **la sénescence**.

## Chapitre 3 : La sénescence endothéliale

### I- La sénescence cellulaire

La sénescence cellulaire a été définie pour la première fois par Leonard Hayflick en 1961. Il remarqua que des fibroblastes en culture cessaient de proliférer après un certain nombre de divisions cellulaires (Hayflick et Moorhead 1961), alors qu'il était admis que les cellules étaient immortelles et pouvaient se multiplier indéfiniment en culture. Le nombre de cycles effectués par la cellule avant l'arrêt de la division fut appelé « Limite d'Hayflick » et marqua le début du vieillissement ou de la sénescence cellulaire déterminant ainsi la durée de vie.

L'étymologie du mot sénescence vient du mot latin *senex*, signifiant « vieillissement ». La sénescence est définie comme étant le processus physiologique du vieillissement biologique, associé à la dégradation progressive des fonctions d'un organisme, causée par l'accumulation de cellules dysfonctionnelles. Le vieillissement en soi n'est pas une maladie, on ne meurt pas du vieillissement mais des complications pathologiques qui lui sont associées, car le renouvellement des tissus est essentiel à la viabilité de l'organisme. Toutefois, la sénescence est reconnue comme un puissant mécanisme suppresseur de tumeur car elle arrête la prolifération des cellules à risque de transformation maligne et constitue une forte barrière contre la progression du cancer (Vijg *et al.*, 2008). L'ambivalence de la sénescence réside dans le bénéfice précoce sur la prolifération tumorale et l'effet néfaste tardif lié au vieillissement, cette dualité est appelée pléiotropie antagoniste.

Au niveau cellulaire, la sénescence est caractérisée par une forme irréversible d'arrêt de la prolifération (état de non-division), contrairement à la quiescence qui est définie comme un processus réversible, de sorte qu'une stimulation avec des facteurs de croissance appropriés entraîne la reprise de la prolifération. De plus, la sénescence est accompagnée par un ensemble de modifications, au niveau de la morphologie, de la fonction et de l'expression génique.

#### *1.1 Caractéristiques des cellules sénescents*

Bien que les cellules sénescents soient métaboliquement actives, leur arrêt en phase G1 du cycle cellulaire engendre de nombreuses conséquences. D'un point de vue morphologique, les cellules sénescents s'aplatissent et leur volume cellulaire augmente. Une hypothèse en faveur d'une augmentation de la synthèse protéique via l'activation de la protéine mTOR (*mammalian*

*Target Of Rapamycin*) a été émise pour expliquer ce phénomène (Fingar *et al.*, 2002 ; Mamane *et al.*, 2006). D'autres équipes suggèrent cependant des modifications au niveau de la structure du cytosquelette (Nishio *et al.*, 2001). Une autre caractéristique morphologique observée est l'augmentation du nombre et de l'activité des lysosomes. Cette caractéristique est à l'origine de l'activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (SA- $\beta$ -gal). En effet, il a été montré que les cellules sénescents expriment une activité  $\beta$ -galactosidase détectable à pH 6,0 et différente de l'activité  $\beta$ -galactosidase acide, présente dans toutes les cellules et détectable à pH 4,0 (Debacq-Chainiaux, 2009). L'activité SA- $\beta$ -gal est devenue un marqueur largement utilisé dans l'étude de la sénescence *in vitro* et *in vivo*.

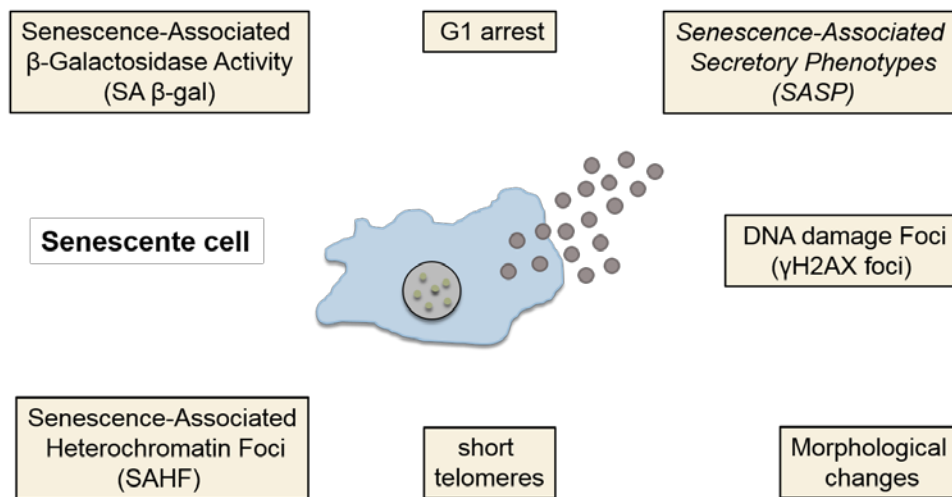
D'un point de vue génique, les cellules sénescents présentent une expression excessive des gènes de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines, des facteurs de croissance et des protéases. Cette caractéristique est appelée phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP). L'ensemble de ces caractéristiques confère une forte capacité aux cellules sénescents à interagir avec leur environnement, afin de favoriser et amplifier l'inflammation, qui joue un rôle majeur dans les maladies liées au vieillissement telles que l'athérosclérose (Chung *et al.*, 2009 ; Sikora *et al.*, 2011). De plus, certaines protéines du SASP pourraient renforcer l'arrêt du cycle cellulaire, notamment les cytokines inflammatoires (interleukines) et les chimiokines (Kuilman *et al.*, 2008 ; Young *et al.*, 2009).

Au niveau nucléaire, la structure de la chromatine détermine si le gène est transcriptionnellement actif (euchromatine) ou silencieux (hétérochromatine). Les cellules sénescents présentent une structure de foyers d'hétérochromatine condensés caractéristiques, appelés SAHF (senescence-associated heterochromatin foci (Narita *et al.*, 2003). Ces foyers peuvent être visibles au microscope en utilisant un marqueur d'ADN tel que le DAPI, où ils apparaissent sous forme de grappes, contrairement à une coloration homogène dans les cellules non sénescents. Parce que la structure d'hétérochromatine dépend principalement des modifications des histones par acétylation ou méthylation, l'acétylation de la lysine 9 ou la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3K9, est un marqueur exclusif des SAHF. Les SAHF sont connus pour réprimer plusieurs gènes régis par le facteur de transcription E2F, tels que les cyclines, et pour être produits par plusieurs voies impliquant l'activation des protéines p16 ou p53.

L'ensemble de ces caractéristiques peut ainsi être utilisé comme marqueurs de la sénescence *in vitro* ou *in vivo*.

La réponse aux dommages à l'ADN (DDR : *DNA Damage Response*) implique l'action concertée de plusieurs complexes protéiques qui se mobilisent vers le site de la lésion de l'ADN. Ces complexes comprennent  $\gamma$ -H2AX, ATM, ATR, 53BP1, MRN et CHK1 / 2 et restent des marqueurs de sénescence, bien que peu spécifiques car communs à la voie de l'apoptose.

Il convient de noter que de nombreux concepts liés à la sénescence ont été développés à partir d'études sur les fibroblastes humains et de certaines lignées cellulaires immortalisées. Par conséquent, leur pertinence doit être questionnée pour les cellules endothéliales primaires.



**Figure 7 : Caractéristiques des cellules sénescents**

## *I-2 Mécanismes de la sénescence :*

### *I-2.1 La sénescence réplivative*

La sénescence cellulaire est souvent observée après un certain nombre de divisions, on parle alors de sénescence réplivative (Erysalimsky *et al.*, 2009). De nombreuses études ont suggéré que la sénescence réplivative pouvait être à l'origine du vieillissement physiologique. Ce type de sénescence serait déclenché par le raccourcissement progressif ou un dysfonctionnement éventuel des télomères, une séquence d'ADN située à l'extrémité des chromosomes. En effet, les cellules perdent entre 50 à 300 nucléotides télomériques après chaque division (Levy *et al.*, 1992 ; Allsopp *et al.*, 1995), jusqu'à arriver à une longueur critique, qui déclenche l'arrêt du

cycle cellulaire. Cette observation est à l'origine de l'hypothèse de « l'horloge mitotique ». Aucune autre structure chromosomique que les télomères, n'a été autant associée à la longévité.

### I-2.1.1 Synthèse des télomères

En raison d'un défaut de la machinerie de réplication de l'ADN, appelé « *end replication problem* » les ADN polymérasés conventionnelles sont incapables de répliquer la fin du brin d'ADN retardé, entraînant ainsi une perte progressive de nucléotides au niveau des télomères. Les télomères se composent d'une même séquence répétée de six nucléotides (TTAGGG) qui s'étend sur une longueur de 10 à 15 kilobases. L'extrémité 3' simple brin du brin retardé, s'insère dans la molécule d'ADN double brin au niveau des télomères, formant une boucle T qui ne laisse plus apparaître l'extrémité simple brin sortante, empêchant ainsi sa reconnaissance comme cassure, par la machinerie de réparation de l'ADN, pouvant conduire à la mort cellulaire. Cette conformation est stabilisée par un ensemble de protéines de liaison spécialisées appelées shelterin, un complexe hétérodimérique de six protéines, TRF1, TRF2, Pot1-TPP1, Rap1, et Tin2. (Martinez *et al.*, 2011). Ces protéines protègent également les extrémités des chromosomes de la dégradation ou de la fusion. (cf. figure 8).

La synthèse de l'ADN télomérique nécessite la présence d'une ADN polymérase particulière, la télomérase (Collins *et al.*, 2000), un complexe de ribonucléoprotéines constitué d'une sous-unité enzymatique, hTERT (human telomerase reverse transcriptase) qui catalyse l'addition de la séquence TTAGGG à l'extrémité 3' de l'ADN grâce à son activité de transcriptase inverse en utilisant une amorce d'ARN présente dans la sous unité régulatrice, hTERC (human telomerase RNA component) (McEachern *et al.*, 2000 ; Blackburn *et al.*, 2001).

La majorité des cellules somatiques présentent un niveau très faible de télomérase, contrairement aux cellules germinales ou encore les cellules tumorales. L'inhibition de la télomérase par un ARNi induit l'arrêt de la croissance tumorale (Li *et al.*, 2005). En revanche, la surexpression de la télomérase chez des souris augmente leur espérance de vie (Gonzalez-Suarez et Samper, 2001) indiquant un effet bénéfique de la télomérase sur le vieillissement. Au niveau vasculaire, des études ont montré que la longueur des télomères est inversement proportionnelle à l'âge des cellules endothéliales de l'aorte abdominale humaine, des artères iliaques et des veines iliaques (Chang *et al.*, 1995 ; Aviv *et al.*, 2001).

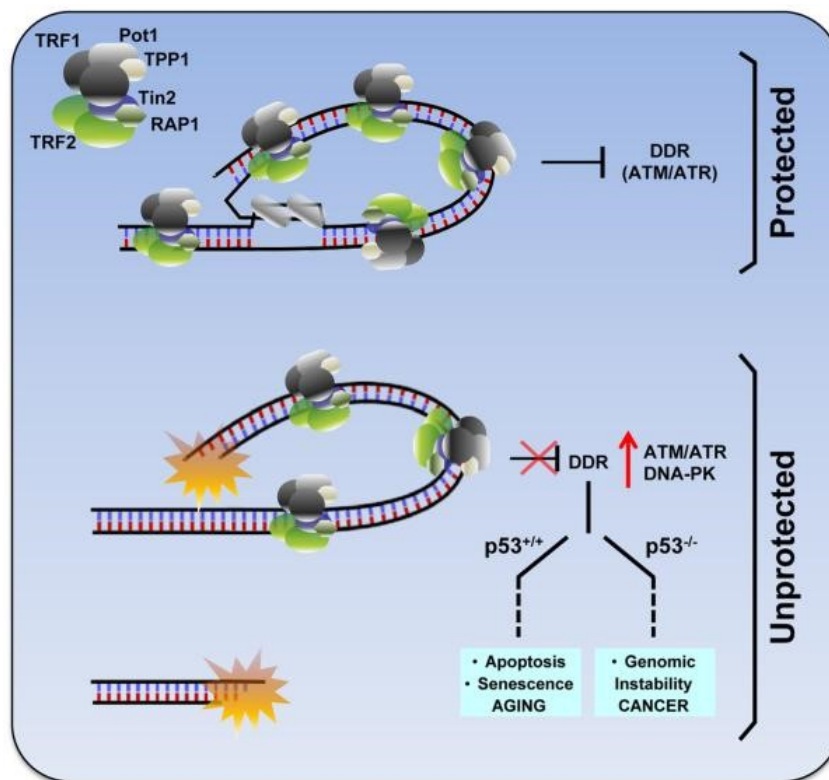


Figure 8 : Le raccourcissement des télomères induit la sénescence (Herrera *et al.*, 2010)

### I-2.2 La sénescence prématurée

D'autres études ont rapporté que les mêmes cellules capables d'entrer en sénescence répliquative après un certain nombre de division, pouvaient également présenter une sénescence, malgré un faible nombre de divisions cellulaires, suggérant l'existence d'autres inducteurs de la sénescence indépendamment du raccourcissement des télomères. Il a été rapporté que l'extension des télomères par surexpression de la télomérase dans des fibroblastes humains ne protège pas de la sénescence observée après leur exposition aux UV,  $\gamma$ -irradiation, ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (Gorbunova *et al.*, 2002), confirmant l'existence d'une sénescence indépendante des télomères.

En effet une sénescence prématurée est également inductible en réponse à différents stress cellulaires. (Erysalimsky *et al.*, 2009). Ces sources de stress sont classées en deux catégories: les SIPS (Stress-Induced Premature Senescence) comprenant le stress oxydant ou les dommages à l'ADN, et les OIS (Oncogene-Induced Senescence) impliquant la stimulation

mitogénique persistante ou l'exposition à des radiations. La sénescence prématurée se produit également dans des cellules de souris qui, contrairement à la plupart des cellules humaines, expriment constitutivement la télomérase (Prowse et Greider 1995) et possèdent de longs télomères (5 à 10 fois plus long que chez l'homme) (Kipling et Cooke, 1990), c'est pourquoi les télomères murins ne servent pas d'horloge mitotique pour le vieillissement répliatif.

Le développement de la sénescence endothéliale prématurée en conditions pathologiques s'avère être une réponse précoce au stress induit par les différents facteurs de risques tels que le diabète, l'hypertension, le tabagisme ou l'hyperglycémie. En effet, les facteurs de risque cardiovasculaire sont associés à une augmentation des niveaux de stress oxydant (Csiszar *et al.*, 2002). Ainsi, les crosses aortiques des rats spontanément hypertendus (SHR) montrent une augmentation du marquage SA- $\beta$ -gal, associée à une augmentation de la phosphorylation de l'histone  $\gamma$ H2AX et une surexpression de p53, comparativement aux rats témoins Kyoto (Han *et al.*, 2012). De même, le marquage SA- $\beta$ -gal a été observé dans l'aorte thoracique des rats diabétiques obèses Zucker (ZDF) mais reste indétectable chez leurs homologues maigres (ZL) (Chen *et al.*, 2002).

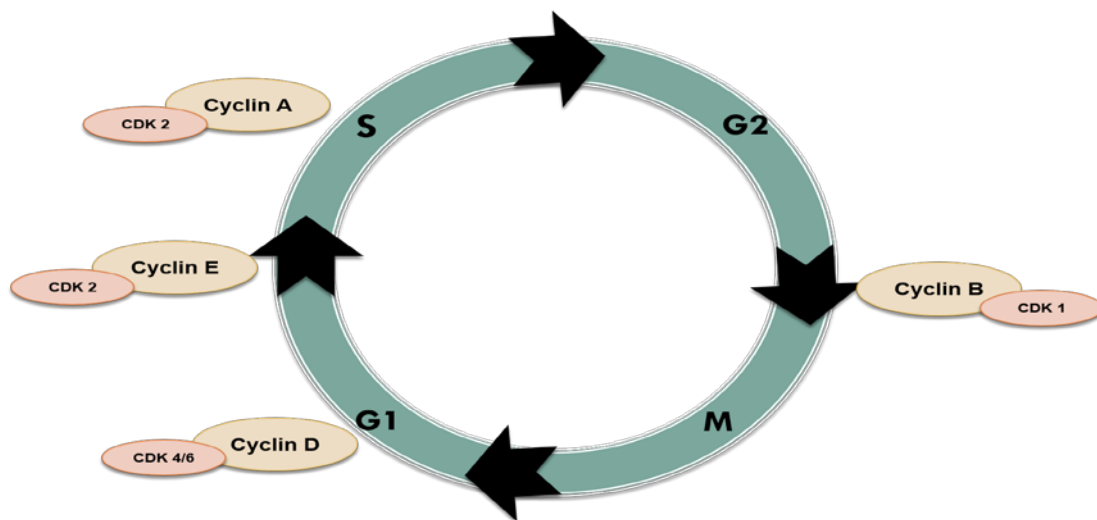
La distinction entre la sénescence répliative, induite par le raccourcissement des télomères, ou la sénescence prématurée, induite par le stress, reste délicate. Il est très probable que les deux types de sénescence puissent contribuer conjointement aux processus pathologiques *in vivo*. Un raccourcissement excessif des télomères a été observé dans les globules blancs circulants des patients atteints d'hypertension (Jeanclos *et al.*, 2000), d'athérosclérose coronarienne (Samani *et al.*, 2001; Fitzpatrick *et al.*, 2007; Brouillette *et al.*, 2007), d'infarctus du myocarde (Brouillette *et al.*, 2003), et de diabète (Jeanclos *et al.*, 1998) suggérant que les facteurs de risques cardiovasculaires pourraient également affecter le potentiel répliatif des cellules *in vivo*, et accélérer le processus du vieillissement physiologique (Chen et Goligorsky, 2006). Il a été montré que la sénescence prématurée les CEs provenant de patients athérosclérotiques présentaient les mêmes composantes des voies de la sénescence répliative (Voghel *et al.*, 2007). En effet, l'athéro-thrombose est un processus inflammatoire caractérisé, entre autres, par une hyperprolifération dite « réparatrice » des CEs et des CML, pouvant expliquer le raccourcissement des télomères observé dans ces cellules. En outre, chez des patients athérosclérotiques, le développement de la sénescence des CEs, corrèle avec la durée d'exposition aux facteurs de risque cardiovasculaire et le degré de sévérité de la maladie plutôt



qu'avec l'âge. Une surexpression de la télomérase dans ces cellules stabilisent la longueur des télomères et ralenti l'apparition de la sénescence (Voghel *et al.*, 2007).

### *I-3 Régulation du cycle cellulaire*

La succession des diverses phases du cycle cellulaire à savoir l'interphase (G1, S et G2) et les phases de la mitose (prophase, métaphase, anaphase, télophase) est régulée par la mise en place de différents points de contrôle pouvant stopper le cycle cellulaire si les conditions de viabilité cellulaire ne sont pas remplies. Lorsqu'un dommage d'ADN est détecté, le cycle cellulaire est momentanément interrompu jusqu'à la réparation ou le cas échéant l'entrée en sénescence ou en apoptose.



**Figure 9 : Régulation du cycle cellulaire par les complexes Cyclin Dependend Kinase-Cyclin**

Les points de contrôle sont régulés par des complexes cyclines-CDK (cyclin dependent kinases) spécifiques. Les CDK sont des sérine-thréonine kinases permettant la phosphorylation de nombreuses protéines intervenant dans le cycle cellulaire, tandis que les cyclines sont dépourvues d'activité enzymatique et servent de sous-unité régulatrices des CDK. La cellule entre et sort du cycle cellulaire selon l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des cyclines, dont la synthèse n'est pas constante. L'inhibition de ces complexes entraîne un arrêt du cycle

cellulaire. Les inhibiteurs des CDK, les CKIs, se divisent en deux principales familles : la famille INK4 et la famille Cip/Kip.

Pendant la phase G1, une cible importante des complexes cycline-CDK est **la protéine du rétinoblastome (Rb)**. Sous sa forme active déphosphorylée, elle forme un complexe avec le facteur de transcription E2F réprimant ainsi l'expression de nombreux gènes impliqués dans la régulation du cycle. La phosphorylation de Rb libère le facteur de transcription E2F qui se fixe sur les promoteurs de différents gènes impliqués dans la progression du cycle et permet l'entrée en mitose (Schafer *et al.*, 1998).

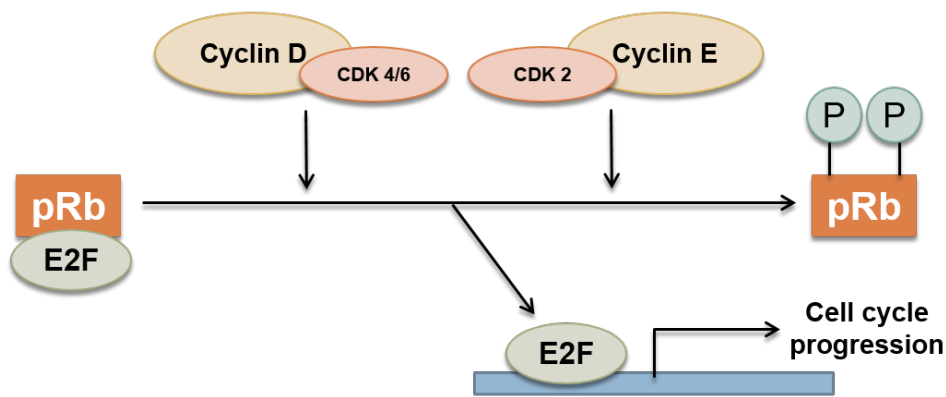


Figure 10 : Activation de E2F par le complexe CDK-cycline, (selon Schafer *et al.*, 1998)

#### *I-4 Mécanisme de l'arrêt du cycle cellulaire dans la sénescence*

Les deux mécanismes de sénescence, répllicative et prématurée, impliquent souvent la voie des suppresseurs de tumeur p16/Rb ou p53/p21, qui orchestrent l'arrêt du cycle cellulaire.

**La protéine p53** régule d'une part la mort cellulaire par apoptose via l'activation de la protéine pro-apoptotique BAX (Miyashita et Reed 1995), et d'autre part la sénescence via l'activation de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21 (el-Deiry, *et al.*, 1993). En réponse au raccourcissement des télomères ou après un dommage d'ADN, p53 est phosphorylée sur le résidu sérine 15 par la ATM, ou sur le résidu sérine 20 par la kinase CHK2 (ATM et CHK2 étant les protéines de la *DDR : DNA Damage Response*), ce qui stabilise p53 empêchant sa liaison à son principal inhibiteur, mdm2. L'ubiquitylation de p53 par mdm2 entraîne sa dégradation dans le protéasome. Par ailleurs, l'acétylation de p53 sur les résidus lysine 382 et 320 permet sa liaison à l'ADN et augmente son activité transcriptionnelle permettant la surexpression de son principal gène cible dans les cellules sénescents, p21/WAF1 (Webley *et al.*, 2000).

**La protéine p21** est un inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines de la famille Cip/Kip, elle se lie au CDK2, empêchant la formation du complexe cycline E-CDK2 et la transition G1-S (Harper *et al.*, 1993, cf. paragraphe précédent).

**La protéine p16** est un autre inhibiteur de CDK impliqué dans la sénescence. La surexpression de p16 intervient après l'activation de p21 et l'arrêt de prolifération, insistant sur le rôle essentiel de p21 dans l'initiation de la sénescence (Alcorta *et al.*, 1996; Stein *et al.*, 1999; Dulic *et al.*, 2000). Quant à la protéine p16, elle semble être associée au maintien de l'arrêt de prolifération et du phénotype de sénescence. p16 appartient à la famille INK4a. Elle interagit avec CDK4 et CDK6 pour induire l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1, de manière dépendante de la protéine Rb (Parry *et al.*, 1995). Contrairement à p21, p16 n'est pas sous le contrôle de p53. Elle est régulée par la voie RAS-RAF-MEK.

Il existe également un débat sur la nécessité et la contribution de chacune des voies de suppresseurs de tumeurs pour initier l'entrée en sénescence. Dans les fibroblastes humains les deux voies peuvent être impliquées (Itahana *et al.*, 2004). Il a été proposé que les programmes de sénescence distincts puissent progresser en parallèle, entraînant des «cultures en mosaïque», certaines cellules exprimant p21 d'autres p16 ou les deux (Ben-Porath *et al.*, 2004).

À l'origine, la sénescence cellulaire a été définie comme un arrêt irréversible dans la phase G1 du cycle cellulaire, initié par l'inactivation des complexes cycline D1-Cdk4/6 et cycline E1-Cdk2 qui régulent la progression de la phase G1 vers la phase S. Cependant, une idée récente a émergé, suggérant que la sénescence pourrait également être induite lors de la phase G2, après la découverte que p21 régule également les points de contrôle G2 / M. Mao *et al.* ont été les premiers à montrer l'existence *in vitro*, de cellules sénescents avec une teneur en ADN 4N (Mao *et al.*, 2012). De plus, l'apparition *in vivo* de cellules sénescents 4N dans le mélanocyte humain naevi, suggère que l'arrêt en phase G2 a également un rôle dans la sénescence (Michaloglou *et al.*, 2005).

## **II- Contribution de la sénescence cellulaire dans vieillissement vasculaire**

Il est évident que la sénescence ne peut expliquer toutes les modifications cellulaires ou organiques associés au vieillissement. Néanmoins, un nombre important d'études confirment une association entre les pathologies liées au vieillissement et la sénescence cellulaire. La

clairance des cellules sénescents p16 positives, en utilisant un transgène, INK-ATTAC, pour induire l'apoptose des cellules exprimant p16 Ink<sup>4a</sup>, a prolongé la durée de vie des souris, et a atténué la détérioration liée à l'âge de plusieurs organes tels que le rein, le cœur et les adipocytes (Baker *et al.*, 2016).

Plusieurs groupes de recherche ont examiné l'hypothèse selon laquelle la sénescence des cellules vasculaires pourrait contribuer à la pathogenèse des maladies cardiovasculaires, et ont utilisé la sénescence cellulaire comme un modèle de vieillissement *in vivo*.

Burridge a été l'un des premiers à observer la présence de cellules endothéliales large avec une surface supérieure à 800  $\mu\text{m}^2$  *in vivo*, recouvrant les plaques d'athérosclérose avancée (Burridge 1991). Un peu plus tard, cette notion a été confirmée par une analyse cytochimique *in vivo* de l'activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (SA  $\beta$ -gal). L'examen histologique des plaques d'athérosclérose humaines a confirmé la présence de cellules endothéliales et de cellules musculaires lisses SA- $\beta$ -gal positives, ces cellules ont également montré une surexpression de p53, p21 et p16 et des télomères courts. Childs *et al.* ont examiné le rôle des cellules sénescents dans les différents stades de l'athérogenèse par des méthodes génétiques permettant la clairance des cellules sénescents dans les plaques, ont montré que ces cellules sont nuisibles tout au long de la pathogenèse de la maladie. Les macrophages sénescents s'accumulent dans l'espace sous-endothélial au début de l'athérosclérose, où ils contribuent à l'initiation de la pathologie en augmentant l'expression des cytokines et des chimiokines athérogènes et inflammatoires clés. Dans les lésions avancées, les cellules sénescents favorisent l'instabilité de la plaque, y compris la dégradation de la fibre élastique et l'amincissement de la coiffe fibreuse, en augmentant la production de métalloprotéases. Ces résultats démontrent que les cellules sénescents sont des facteurs clés dans la formation et de la maturation des plaques d'athérome et suggèrent que la clairance sélective de ces cellules par les agents sénolytiques est prometteuse pour le traitement de l'athérosclérose (Childs *et al.*, 2016).

De plus, des cellules endothéliales sénescents ont également été identifiées dans des artères coronaires de patients atteints d'une cardiopathie ischémique, tandis qu'aucune cellule SA- $\beta$ -gal positive n'a été observée dans les artères mammaires internes des mêmes patients (Minamino *et al.*, 2002), soulignant un rôle du territoire vasculaire et l'existence de possibles zones à risque de sénescence. Dans une autre étude, l'accumulation de cardiomyocytes

sénescents présentant un raccourcissement télomérique significatif a été détectée par biopsie endomyocardique dans les cœurs de patients âgés avec cardiomyopathie (Chimenti *et al.*, 2003).

Chez l'animal, une augmentation du nombre de cellules SA- $\beta$ -gal positives présentant une sur-expression de p53, p21 et p16 et un stress oxydant élevé, a été observée dans l'endothélium aortique de rats Zucker obèses et diabétiques (Brodsky *et al.*, 2004 ; Chen *et al.*, 2002). En outre, Fenton *et al.*, ont détecté des cellules endothéliales SA- $\beta$ -gal positives dans les artères carotides de lapin, après une dénudation endothéliale répétée par ballonnet.

L'ensemble de ces études confirme l'existence de la sénescence endothéliale *in vivo* et sa contribution à la pathogenèse des maladies cardiovasculaires.

### *II-1 Sénescence et dysfonction endothéliale*

Au niveau de l'endothélium, quel que soit l'origine de la sénescence (réplicative ou prématurée), les altérations fonctionnelles qui en résultent, conduisent à un phénotype pro-inflammatoire et pro-thrombotique, suggérées pour avoir un rôle dans les maladies cardiovasculaires associées au vieillissement, ou aux facteurs de risque tels que le diabète ou l'hypertension.

Plusieurs études ont confirmé le rôle de la sénescence dans le développement de la dysfonction endothéliale. En effet, la production basale de NO par les cellules endothéliales de veines ombilicales humaines (HUVEC) diminue avec le doublement de la population (Sato *et al.*, 1993). De même, la production de NO en réponse aux forces de cisaillement est également diminuée dans les cellules endothéliales aortiques humaines (HAEC) sénescentes (Matsushita *et al.*, 2001). De plus, la production de prostacycline est également diminuée dans les CEs après plusieurs passages en série (sénescence réplicative), ou après une incubation avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (sénescence prématurée), tandis que la production de thromboxane A<sub>2</sub> est augmentée (Neubert *et al.*, 1997). Une étude a montré par une approche plus directe, que la surexpression ciblée de p53 dans l'endothélium est associée à une diminution des relaxations endothélium-dépendante dans des anneaux aortiques, avec une réduction de la biodisponibilité du NO, alors que des relaxations endothélium indépendantes, au nitroprussiate de sodium, un donneur de NO, n'ont pas été affectées (Kim *et al.*, 2008).

Le rôle de la sénescence dans l'induction de la dysfonction endothéliale a été confirmée par d'autres approches montrant que la prévention de la sénescence, permet d'améliorer la dysfonction endothéliale. En effet, l'extension des télomères par expression ectopique de

hTERT (sous unité catalytique de la télomérase) dans des CE humaines en culture, a prolongé leur durée de vie et protégé contre la dysfonction endothéliale (Yang *et al.*, 1999 ; Minamino *et al.*, 2004). De même, la transfection des CE aortiques humaines par la télomérase, a induit un phénotype jeune, retardé le déficit lié à l'âge au niveau de l'expression de la eNOS et augmenté la production de NO (Matsushita *et al.*, 2001).

## *II-2 Le stress oxydant à l'origine de la sénescence endothéliale*

Les origines de la théorie du vieillissement par les radicaux libres remontent au milieu du 20<sup>ème</sup> siècle, quand on a découvert que les ROS, traditionnellement considérés comme trop réactifs pour exister dans les systèmes biologiques, peuvent être formés *in situ*, en réponse à des rayonnements ionisants, ou à l'oxygène, et sont responsables de réponses délétères. Harman a proposé que les ROS soient formés de manière endogène à partir du métabolisme de l'oxygène et jouent un rôle essentiel dans le processus de vieillissement (Harman, 1956).

Depuis, cette théorie s'est affinée et le stress oxydant demeure l'une des causes les plus fréquemment citées comme à l'origine du vieillissement. Kapahi *et al.*, ont observé une corrélation directe entre la longévité de différentes espèces animales et leurs défenses antioxydantes (Kapahi *et al.*, 1999). Cependant, la plupart des essais cliniques n'ont pu démontrer d'effet bénéfique significatif des antioxydants ( $\alpha$ -tocophérol, vitamines C et/ou E) sur la morbidité et la mortalité associées aux maladies cardiovasculaires (Steinberg et Witztum, 2002).

De nombreuses données expérimentales indiquent que le stress oxydant induit la sénescence suite aux dommages oxydants de l'ADN. Ainsi, le taux d'oxydation de l'ADN mesuré par la libération de 8-dihydroxyguanin est augmenté dans les cellules sénescents (Chen *et al.*, 1995). Le stress oxydant augmente le raccourcissement des télomères (Von Zglinicki *et al.*, 2000), probablement en raison de la richesse particulière de l'ADN télométrique, en bases guanidiques particulièrement vulnérable à l'oxydation.

La mise en culture de CML humaines dans un environnement hypoxique prolonge leur durée de vie et augmente l'activité de la télomérase, comparées à celles cultivées en conditions de normoxie (Minamino *et al.*, 2001). De plus, l'addition d'un antioxydant, N-acétyl cystéine (NAC) dans le milieu de culture, prévient la sénescence répliquative des CE coronaires

primaires de porc (Khemais-Benkhiat *et al.*, 2015). De même la NAC a significativement retardé la sénescence de CEs isolées de segments artériels de patients présentant une maladie coronarienne sévère, activé la sous-unité catalytique de la télomérase (hTERT) et inhibé l'attrition des télomères (Voghel *et al.*, 2008).

A l'inverse, la mise en culture de cellules musculaires lisses d'aortes thoraciques de rat en conditions hyperoxiques (40% d'O<sub>2</sub>) induit des dommages à l'ADN et augmente l'expression des protéines associées à la sénescence (Huyard *et al.*, 2014). Il a été observé que l'hyperoxie entraîne un raccourcissement accéléré des télomères (66 paires de bases perdues à 20% d'O<sub>2</sub> versus 486 paires de bases à 40% d'O<sub>2</sub>), accompagné par une activation de p53 et une sénescence prématurée (Vaziri *et al.*, 1997).

De fait, la sénescence induite par le stress oxydant constitue un modèle de sénescence accélérée ou prématurée fréquemment utilisé. Un raccourcissement accéléré des télomères a été observé après traitement de fibroblastes humains par le peroxyde d'hydrogène. L'exposition chronique des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) à des doses non cytotoxiques de peroxyde d'hydrogène ou à un inhibiteur de la synthèse du glutathion, sulfoxamine de buthionine, accélère l'entrée en sénescence après 30 versus 46 doublements de population (Kurz *et al.*, 2004). De même, l'exposition de CEs d'artères coronaires de porc au peroxyde d'oxygène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) augmente l'activité SA-β-galactosidase et l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire (Abbas *et al.*, 2016).

Symétriquement, la réduction de l'activité des peroxydes intracellulaires à l'aide d'un piègeur, alpha-phényl-t-butyl-nitron, réduit le degré de raccourcissement des télomères et augmente la durée de vie des cellules (Von Zglinicki *et al.*, 2000).

### ***II-3 Rôle du système Angiotensine dans la sénescence vasculaire***

Benigni *et al.* ont montré que l'inactivation du récepteur AT-1 de l'Ang II augmente la longévité chez la souris. Lorsque toutes les souris de type sauvage sont mortes, 85% des souris KO AT-1R étaient encore en vie. (Benigni *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent que le système angiotensine joue un rôle clé dans le processus du vieillissement lui-même.

Les composantes du système rénine-angiotensine se sont révélés être augmentés dans les tissus d'animaux âgés (Wang *et al.*, 2003), et l'inhibition du RAS par les sartans ou les IEC, montre un effet protecteur contre les maladies vasculaires liées à l'âge chez les rongeurs, tels que l'hypertension et l'athérosclérose (Basso *et al.*, 2005 ; de Cavanagh *et al.*, 2004), et limitent le développement de maladies cardiovasculaires liées à l'âge chez l'homme (Brown *et al.*, 2005).

L'Ang II est en effet susceptible de contribuer aux maladies vasculaires liées à l'âge telles que l'athérosclérose en favorisant la sénescence des CMLs et des CEs (Kunieda *et al.*, 2006 ; Shan *et al.*, 2008 ; Shan *et al.*, 2014).

Herbert *et al.*, ont démontré que l'Ang II induit la sénescence des CML humaines en réponse aux dommages d'ADN causés par les ROS. Cette réponse impliquait simultanément les deux voies de la sénescence, répliquative et prématurée, car cette induction était associée à un raccourcissement des télomères, cependant, la transfection des CML par la sous unité hTERT de la télomérase n'a pas suffi pour prévenir la sénescence induite par l'Ang II. Seule la pré-incubation des cellules avec le Losartan (un antagoniste des AT-1R) ou la catalase (un antioxydant) a permis de prévenir la sénescence induite par l'Ang II et les dommages d'ADN associés (Herbert *et al.*, 2007). Ces résultats suggèrent que l'Ang II, via le récepteur AT-1R et la production de ROS, entraîne des dommages à l'ADN dans les CML à l'origine de l'arrêt du cycle cellulaire et de la sénescence. *In vitro*, l'Ang II diminue l'activité de la télomérase des cellules endothéliales progénitrices, effet qui est prévenu par la superoxyde dismutase, suggérant à nouveau l'implication du stress oxydant (Imanishi *et al.*, 2005).

Plusieurs mécanismes moléculaires ont été proposés afin d'expliquer l'induction de la sénescence vasculaire par l'Ang II. La stimulation des cellules endothéliales progénitrices par l'Ang II, augmente l'expression de gp91phox, sous-unité de la NADPH oxydase, contribuant ainsi au stress oxydant, comme en témoigne la formation de peroxy-nitrite (Imanishi *et al.*, 2004, 2005). L'exposition des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) à l'Ang II induit la sénescence par l'intermédiaire de la production de ROS mitochondriaux libérés par la perte du potentiel membranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) et la redistribution membranaire du cytochrome C. Ces effets mitochondriaux sont prévenus par le benazepril, un inhibiteur de l'enzyme de conversion ou par le Losartan, symétriquement, le traitement des HUVEC par un activateur des pores de transition mitochondriaux (mPTP), le cyanure de carbone 3-chlorophénylhydrazone (CCCP) induit des dommages mitochondriaux similaires à ceux induits



par l'Ang II, accompagnés par une augmentation des marqueurs de la sénescence. Cependant, ces effets ne sont pas prévenus par le bénazépril ou le Losartan, confirmant le rôle des dommages mitochondriaux dans l'induction de la sénescence par l'Ang II dans les HUVEC. De plus, outre l'induction du stress oxydant, l'Ang II déséquilibre la balance redox-sensible intracellulaire en diminuant les défenses antioxydantes. Il a été montré que l'Ang II diminue l'expression de la catalase, en empêchant la liaison du facteur de transcription FoxO1 (forkhead box O1) au promoteur du gène de la catalase (Xiong *et al.*, 2010).

D'autres acteurs et mécanismes moléculaires sont impliqués dans la sénescence induite en réponse à l'Ang II comme l'activation des petites protéines G Ras, les protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) et des facteurs de transcription tels que le facteur nucléaire NF-kB et AP-1 (Blagosklonny, 2003).

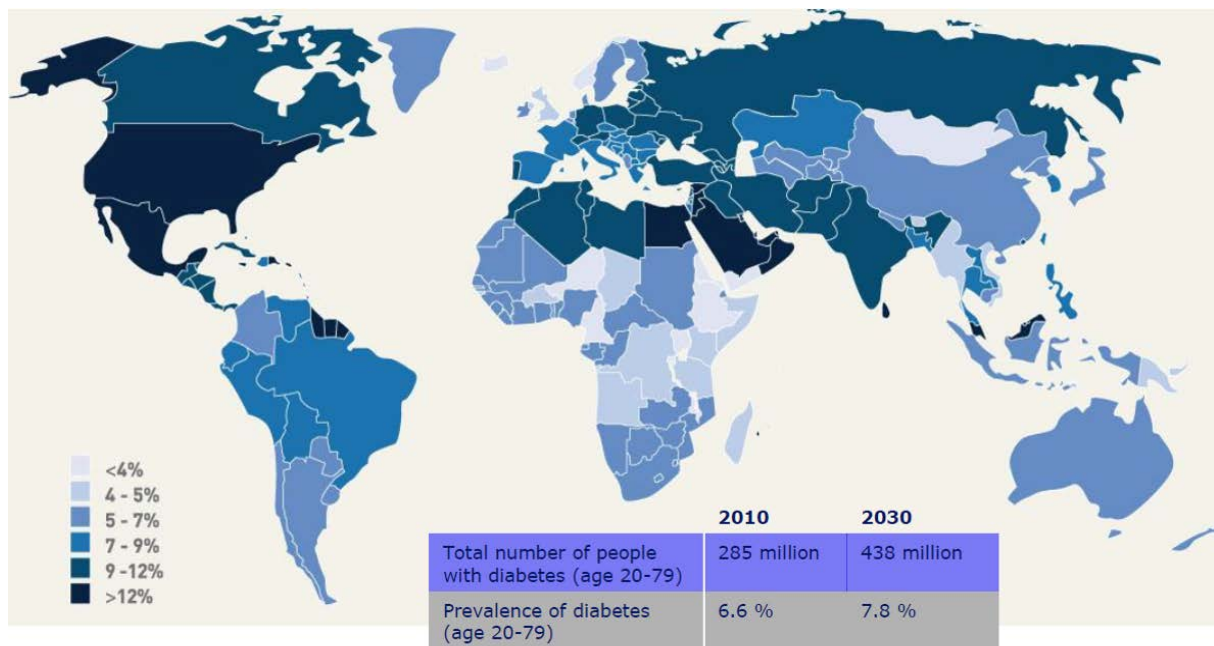
## Chapitre 4 : Diabète, sénescence et dysfonction endothéliale

### I- Le diabète

Le diabète est une maladie métabolique de causes multiples génétiques et environnementales, définie par une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/l (7 mmol/l) ou par une glycémie supérieure à 2 g/l (11.1 mmol/l) à un moment quelconque de la journée, en présence ou non de signes cliniques d'hyperglycémie : polyurie, polydipsie, perte de poids inexplicée souvent associée à une polyphagie. Cette hyperglycémie peut être liée à une anomalie de la sécrétion d'insuline ou de son action, ou à la combinaison des deux. L'insuline sécrétée par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans au niveau du pancréas est la principale hormone hypoglycémiante de l'organisme. Elle est indispensable à la captation et l'utilisation du glucose sanguin par les cellules cibles. De plus, l'insuline favorise le stockage du glucose sous forme de glycogène au niveau hépatique et musculaire et permet l'inhibition de la néoglucogenèse hépatique et de la lipolyse dans le tissu adipeux (Pinget *et al.*, 2002).

#### *I-1 Epidémiologie du diabète*

Le diabète constitue un véritable problème de santé publique. Son incidence ne cesse de croître de manière exponentielle. En effet, selon la Fédération Internationale du Diabète (FID), le DT2 affecte 387 millions de personnes dans le monde en dehors de la proportion de diabétiques non diagnostiqués qui est estimée à près de 46%, soit environ 175 millions d'habitants. Si cette tendance se poursuit, 600 millions de personnes seront atteintes de diabète en 2035 (IDF Diabetes Atlas, 2014. 6<sup>ème</sup> édition), chiffre qui semble être sous-estimé car il ne tient compte que de l'évolution démographique sans considérer l'allongement de l'espérance de vie, les changements des habitudes alimentaires et la sédentarité dans les sociétés industrialisées. En effet, la prévalence grandissante du DT2 est attribuée, sans nul doute, aux changements de style de vie et à l'explosion démographique de l'obésité qui en découle. Le diabète impose un énorme fardeau économique en se plaçant en troisième position des prises en charge des Affections Longues Durée (ALD).



**Figure 11 : Estimation de la prévalence mondiale du diabète en 2030**

### *I-2 Physiopathologie et génèse du diabète*

Il existe principalement deux types de diabète: le diabète de type 1 et le diabète de type 2. **Le diabète de type 1 (DT1)**, est une maladie auto-immune dans 90 % des cas (idiopathique dans 10 % des cas), aboutissant à une destruction massive des cellules bêta pancréatiques et à l'inaptitude du pancréas à produire de l'insuline. Ce type de diabète apparaît souvent pendant l'enfance ou l'adolescence. **Le diabète de type 2 (DT2)**, est le type de diabète le plus fréquent (90% des diabètes connus). Il est caractérisé par une résistance à l'insuline qui correspond à un état pathologique dans lequel les tissus périphériques (foie, tissus adipeux et muscles squelettiques) ne répondent pas correctement à l'insuline. Les cellules  $\beta$  sécrétrices d'insuline produisent en retour d'avantage d'insuline pour maintenir une glycémie normale, on parle alors d'hyper-insulinémisme. Suite à cette hypersécrétion chronique d'insuline, les cellules  $\beta$  s'épuisent, la production d'insuline devient alors insuffisante (insulinopénie). En conséquence, le glucose circulant ne pouvant entrer dans les tissus cibles s'accumule dans le sang, engendrant une hyperglycémie. L'apparition du DT2 est lente. Le DT2 peut rester asymptomatique pendant plusieurs années et est souvent découvert de manière fortuite, tout en évoluant avec un degré d'hyperglycémie suffisant pour engendrer des atteintes organiques et fonctionnelles dans de nombreux tissus. Le retard de diagnostic est estimé à 5 ans. Ce type de diabète s'installe le plus souvent chez des personnes adultes et très

majoritairement en surpoids. Il existe d'autres formes de diabète: le diabète gestationnel et le diabète dit secondaire, résultant de conditions spécifiques, par exemple le traitement par immunosuppresseurs (New-onset diabetes mellitus).

### *I-3 Traitements du diabète*

L'objectif du traitement du diabète consiste d'une part à contrôler la glycémie du patient, et d'autre part à contrôler la progression des complications liées à la glucotoxicité.

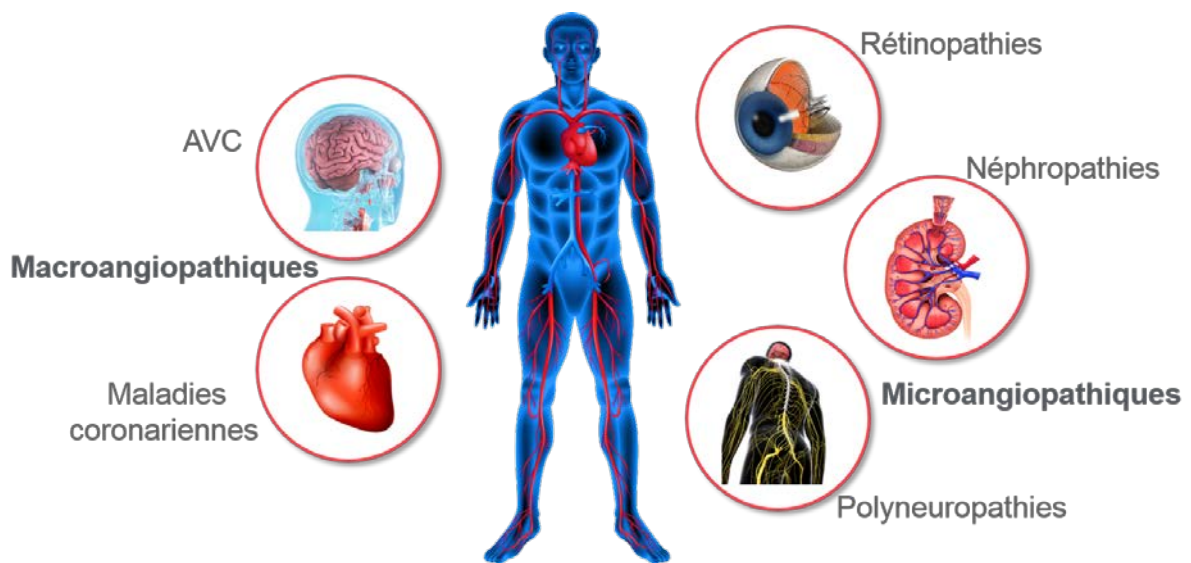
La première étape de la prise en charge du DT2 nécessite la mise en place de règles hygiéno-diététiques : régime alimentaire équilibré, activité physique régulière (au moins 30 min 3 fois par semaine), une réduction pondérale et l'arrêt du tabagisme. En cas d'échec des mesures d'hygiène de vie (non obtention de la cible glycémique), les antidiabétiques oraux sont introduits pour permettre le contrôle glycémique. L'arsenal thérapeutique du diabète est très riche en molécules ciblant les différents organes impliqués dans l'homéostasie du glucose. Puisque le diabète est dû à une anomalie de la sensibilité à l'insuline et/ou de sa sécrétion, deux grandes familles de médicaments ont été développées pour corriger ces anomalies: les **insulinosensibilisateurs** qui comprennent la famille des biguanides et les **insulinosécréteurs** comprenant les sulfamides hypoglycémiantes, les glinides, les incrétinomimétiques et les incrétinomodulateurs.

Malgré cet arsenal thérapeutique important, le contrôle glycémique est souvent insuffisant, et de trop nombreux patients souffrent et meurent encore des complications essentiellement cardiovasculaires associées au diabète. Ceci amène à penser que les mécanismes physiopathologiques conduisant aux atteintes vasculaires chez le diabétique ne sont pas encore totalement élucidés, et que les moyens actuels de prise en charge sont insuffisants pour une protection optimale du système vasculaire.

### *I-4 Complications du diabète*

De nombreuses études épidémiologiques ont montré que la chronicité de l'hyperglycémie est responsable de complications touchant de multiples organes, notamment les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux sanguins. Les troubles vasculaires affectent les micro-vaisseaux (artérioles de moins de 200  $\mu\text{m}$  de diamètre), à l'origine de **complications microangiopathiques** telles que la neuropathie, la rétinopathie et la néphropathie diabétique.

L'hyperglycémie affecte également les gros vaisseaux sanguins comme les artères coronaires, les artères cérébrales et celles des membres inférieurs, à l'origine de **complications macroangiopathiques**, susceptibles d'entraîner un infarctus du myocarde (IDM), des accidents vasculaires cérébraux (AVC), ou une artériopathie oblitérante des membres inférieurs pouvant conduire à des troubles trophiques à l'origine d'une importante morbidité ou d'amputations (Monnier *et al.*, 2007). Ces deux types de complications coexistent et induisent souvent des effets d'aggravation mutuelle.



**Figure 12 : Complications macroangiopathiques et microangiopathiques du diabète**

## II- Hyperglycémie et toxicité vasculaire (glucotoxicité)

Les mécanismes reliant l'hyperglycémie aux événements CV n'ont pas été entièrement élucidés. Cependant, une triade constituée par l'inflammation vasculaire, le stress oxydant et la dysfonction endothéliale est considérée comme centrale et créant un cercle vicieux favorable à l'établissement d'un endothélium pro-athérombotique.

### *II-1 L'hyperglycémie et dysfonction endothéliale et vasculaire*

Il a été montré de façon récurrente que l'hyperglycémie chronique induit une dysfonction endothéliale caractérisée par une diminution de la relaxation-dépendante de l'endothélium dans différents lits vasculaires (De Vriese *et al.*, 2000 ; Shi *et al.*, 2009). Plusieurs facteurs semblent contribuer à la dysfonction endothéliale liée au diabète.

La réduction de la biodisponibilité du **NO**, en raison d'une diminution de l'expression et de la phosphorylation de la **eNOS** (Matsumoto *et al.*, 2014) et une production accrue de **ROS** (Alves-Lopes *et al.*, 2016) constituent une cause majeure. Ainsi, une diminution de l'expression de la eNOS est observée dans le cœur (Peng *et al.*, 2015. Lei *et al.*, 2013), dans les CE de vaisseaux cérébraux (Poittevin *et al.*, 2015), glomérulaires (Hou *et al.*, 2014) et de la rétine (Omae *et al.*, 2013) dans des modèles diabétiques murins. À l'inverse, une surexpression de la eNOS chez les souris diabétiques transgéniques améliore la réactivité vasculaire cérébrale (Chandra *et al.*, 2016), et l'administration de substances pouvant augmenter la production endogène du NO (L-arginine ou inhibiteurs de l'arginase) à des animaux diabétiques, améliore la cardiomyopathie, préserve la fonction rénale (Claybaugh *et al.*, 2014 ; Hsu, *et al.*, 2015) et rétablit le flux sanguin des membres postérieurs ischémiques (Kant *et al.*, 2015 ; Bir. *et al.*, 2014).

Une augmentation de la production d'**EDCF** a également été observée chez les animaux diabétiques. Les contractions médiées par l'EDCF sont augmentées dans les artères de conductance, telles que l'aorte et l'artère rénale (Kagota *et al.*, 2000) et dans les artères de résistance telles que l'artère mésentérique (Vessieres *et al.*, 2013) des rats diabétiques.

Un autre facteur intervenant dans la dysfonction endothéliale liée au diabète est l'**ET-1**. En effet, l'**ET-1** promeut la vasoconstriction et l'inflammation. Il a été démontré que le contrôle

glycémique par administration de Metformine à des rats diabétiques empêche l'activation du système de l'endothéline qui se traduit par une normalisation des niveaux plasmatiques d'ET1 et une diminution de l'expression du récepteur ET A dans l'artère mésentérique (Sachidanandam *et al.*, 2009). De plus, les antagonistes des récepteurs ET préviennent le remodelage vasculaire et la dysfonction cérébro-vasculaire dans les artères cérébrales moyennes des rats diabétiques Goto-Kakizaki (Kelly-Cobbs *et al.*, 2011 ; Harris *et al.*, 2005). L'activation du RAS joue également un rôle important, L'administration des IEC améliore la fonction endothéliale mesurée par FMD chez les patients diabétiques de type1 avec une pression artérielle normale (Arcaro *et al.*, 1999).

### ***II-2 Hyperglycémie et inflammation***

Des taux élevés de cytokines et de facteurs inflammatoires tels que le TNF $\alpha$ , l'interleukine-6, l'ICAM soluble, la protéine MCP-1 et la E-selectine soluble ont été retrouvés dans le sérum de patients et d'animaux diabétiques (Fukui *et al.*, 2013 ; Wu *et al.*, 2016 ; Leguina-Ruzzi. *Et al.*, 2015). En effet, l'hyperglycémie via la génération de ROS induit l'expression de gènes redox-sensibles (le facteur de transcription redox-sensible majeur est NF- $\kappa$ B) conduisant à un phénotype pro-inflammatoire par la surexpression de molécules d'adhésion (VCAM-1) et de cytokines pro-inflammatoires (IFN $\gamma$ ), et pro-coagulant par la surexpression du facteur tissulaire (FT), menant au recrutement et à l'infiltration de monocytes, et à une activation de la cascade de coagulation. L'ensemble de ces événements crée un environnement endothélial et vasculaire propice à l'athéro-thrombose, à l'origine d'évènements CV tels que les IDM et les AVC et cela en proportion plus élevée chez les patients DT2 que chez les patients à degré de risque CV similaire mais indemnes de diabète.

### ***II-3 Hyperglycémie et stress oxydant***

Dans le diabète, l'augmentation du stress oxydant est attribuée à la production accrue de ROS et à l'altération des défenses antioxydantes. En effet, une augmentation de l'expression de la NADPH oxydase (Li, *et al.*, 2015 ; Shida *et al.*, 2014; Kowluru *et al.*, 2014) et de COX-2 (Roy *et al.*, 2015), ainsi qu'une diminution de l'expression de la manganèse superoxyde dismutase (SOD) (Wang *et al.*, 2015) ont été observées dans les vaisseaux de patients et d'animaux diabétiques. Le traitement des patients atteints de DT2 avec un antioxydant comme la vitamine

C a nettement amélioré la vasodilatation endothélium-dépendante chez ces patients (Ting *et al.*, 1996).

Le stress oxydant lié à l'hyperglycémie est d'origine multiple :

### *II-3.1 Auto-oxydation du glucose*

Le glucose, sous sa forme ène-diol, en présence de métaux de transition, donne naissance à un radical anionique ène-diol ; celui-ci, en réduisant l'oxygène moléculaire, libère des anions superoxydes avec la formation concomitante d'un composé carbonyle. L'anion superoxyde peut se dismuter en peroxyde d'hydrogène qui à son tour, produit des radicaux hydroxyles en présence de métaux de transition (Delattre *et al.*, 1999)

### *II-3.2 Les produits avancés de la glycation (AGEs)*

Les AGEs sont formés suite à une réaction non enzymatique entre les sucres réducteurs comme le glucose et les groupements amines libres des protéines, des lipides ou des acides nucléiques, ce qui provoque une réticulation (cross-linking) de la molécule ciblée affectent sa structure et sa fonction. Cette réaction est également connue sous le nom de réaction de Maillard (Frye *et al.*, 1998). Les AGEs se forment en conditions hyperglycémiques et pendant le vieillissement et contribuent à la physiopathologie des maladies vasculaires du diabète (Schmidt *et al.*, 1995. Rojas *et al.*, 2004). En effet, en se liant à leurs récepteurs membranaires (RAGEs), membres de la famille des protéines de type immunoglobuline, les AGEs provoquent l'activation de multiples voies de signalisation ciblant la NADPH oxydase, la p21, les MAPK ainsi que le facteur de transcription NF-kB et de ses gènes cibles, favorisant ainsi le stress oxydant et une réponse inflammatoire. Les AGEs solubles quant à eux activent les monocytes. Les AGEs les plus répandues dans les vaisseaux diabétiques sont : les N<sup>ε</sup> – carboxy-méthyl-lysine (CML) relativement inertes et les hydroimidazolones, dérivés hautement réactifs du méthyl-glyoxal (MG) et de 3-désoxyglucosone. L'inhibition des RAGEs dans un modèle d'athérosclérose accélérée associée au diabète chez des souris transgéniques, supprime complètement les lésions vasculaires, sans changement des concentrations plasmatiques des lipides ou de la glycémie (Schmidt *et al.*, 1999). En effet, Les AGE réduisent l'activité et la biodisponibilité du NO. Des taux sériques élevés d'AGEs chez les patients atteints de DT2 étaient inversement associés au degré de la vasodilatation dépendante de l'endothélium dans l'artère brachiale, mesurée par échographie vasculaire à haute résolution (Tan *et al.*, 2002).



### *II-3.3 La voie des polyols*

Cette voie du métabolisme du glucose devient active lorsque les concentrations de glucose intracellulaire sont élevées. Elle se déroule en deux étapes durant lesquelles l'aldose réductase (AR) qui a normalement la fonction de réduire les aldéhydes toxiques en alcools inactifs, réduit le glucose en sorbitol à l'aide de la NADPH en tant que cofacteur, le sorbitol est ensuite métabolisé en fructose par la sorbitol déshydrogénase qui utilise la NAD<sup>+</sup> comme cofacteur. Les conséquences sont multiples : **1)** Le sorbitol est un alcool poly-hydroxylé fortement hydrophile. Ne pouvant diffuser à travers les membranes, il s'accumule dans le cytosol avec des conséquences osmotiques pouvant modifier la tonicité intracellulaire par production d'osmolytes intracellulaires pour contrebalancer l'hyper tonicité extracellulaire. **2)** Le fructose produit par la voie polyol peut être phosphorylé en fructose-3-phosphate puis décomposé en 3-désoxyglucosone, un agent glycosylant puissant qui entre dans la formation des AGEs. **3)** L'utilisation de la NADPH par l'aldose réductase la rend moins disponible pour la glutathion réductase, enzyme permettant la régénération d'un antioxydant intracellulaire critique, le glutathion réduit, en présence de NADPH, ce qui réduirait la capacité des cellules à répondre au stress oxydant.

### *II-3.4 L'activation de la protéine kinase C par le diacylglycérol*

Les PKC joue un rôle important dans la dysfonction endothéliale (Hink *et al.*, 2001. Cosentino *et al.*, 2003). Elle induit la production de ROS en stimulant la NADPH oxydase. Le traitement des CEs et des CML aortiques avec l'acide myristique du phorbol (PMA), un activateur de la PKC, a augmenté la production de ROS. Cette augmentation a été inhibée par le diphenylène iodonium, un inhibiteur de la NADPH oxydase (Inoguchi *et al.*, 2000). Le diacylglycérol (DAG), activateur physiologique de la PKC, peut être produit par hydrolyse des phosphoinositides membranaires par la phospholipase C (PLC) ou par synthèse *de novo* à partir d'intermédiaires glycolytiques : le dihydroxyacétone phosphate et le glycérol-3-phosphate (Xia *et al.*, 1994). L'hyperglycémie entraîne une accumulation de DAG au niveau vasculaire et une activation de la PKC, contribuant aux pathologies cardiovasculaires liées au diabète (Geraldès *et al.*, 2010). Des niveaux élevés de DAG ont été retrouvés dans l'aorte et le cœur des rats diabétiques (Inoguchi *et al.*, 1992) L'exposition des CEs et des CML aortiques à une concentration élevée de glucose augmente les taux de DAG et la production de ROS. Cette production a été inhibée par le GF109203X, un inhibiteur spécifique de la PKC (Inoguchi *et al.*, 2000). *In vivo*, l'administration orale de LY333531, un inhibiteur oral de la PKC $\beta$ , a amélioré le taux de filtration glomérulaire, et la circulation rétinienne chez les rats diabétiques

(Ishii *et al.*, 1996). Et chez l'homme, La chérérithrine (inhibiteur de la PKC) a réduit de manière modérée la production de superoxyde (25%) dans les segments d'artères mammaires internes de patients non diabétiques comparé à une réduction significativement plus importante chez les patients diabétiques (> 60%), suggérant que l'inhibition de la PKC diminue la production de ROS vasculaire chez les patients diabétiques.

### *II-3.5 La voie de l'hexoamine*

Lorsque la concentration de glucose intra cellulaire est élevée, la majeure partie du glucose est métabolisé par glycolyse en glucose-6- phosphate, puis en fructose-6-phosphate avant d'entrer dans la voie glycolytique. Cependant, une partie de ce fructose-6-phosphate est détournée dans une autre voie de signalisation dans laquelle une enzyme appelée GFAT (glutamine: fructose-6 phosphate amidotransférase) convertit le fructose-6-phosphate en glucosamine-6-phosphate et favorise ensuite la synthèse de l'uridine diphosphate-N-acétylhexosamine (UDP-GlcNAc) qui sert alors de substrat pour N- ou O- glucosamination de nombreuses protéines, de facteurs de transcription, qui se traduit souvent par des changements pathologiques dans l' expression de nombreux gènes. Par exemple, la glucosamination du facteur de transcription Sp1 entraîne une augmentation de l'expression du TGF- $\beta$ 1 et de PAI-1 dans les CEs.

Des preuves substantielles indiquent que la production de ROS induite par l'hyperglycémie peut favoriser le raccourcissement des télomères et les dommages à l'ADN, et déclencher une réponse dépendante de p53. En effet, l'hyperglycémie chez les patients diabétiques a été démontrée comme un facteur crucial pour accélérer la progression de la sénescence endothéliale.

### *II-4 L'hyperglycémie et la sénescence endothéliale*

Récemment, les arguments se sont multipliés en faveur de l'implication de la sénescence endothéliale comme événement précoce de la dysfonction endothéliale liée au diabète. La sénescence a été décrite dans les vaisseaux de rats diabétiques et dans les CEs exposées à des concentrations élevées de glucose (Yokoi *et al.*, 2006 ; Bhatt *et al.*, 2013).

Une augmentation de l'activité SA- $\beta$ -gal a été observée dans les CEs de l'aorte de souris rendues diabétiques par la streptozotocine (Yokoi *et al.*, 2006), et de l'aorte de rats diabétiques Zucker (Chen *et al.*, 2007).

Chez le patient diabétique, la mesure des télomères leucocytaires a été utilisée comme substitut pour évaluer la sénescence vasculaire, car les biopsies de vaisseaux ne sont pas pratiquées en l'absence de pathologie vasculaire manifeste. La longueur des télomères des monocytes est significativement plus courte chez les diabétiques de type 2 par rapport aux sujets témoins, et inversement proportionnelle aux niveaux des dommages oxydants d'ADN (Sampson *et al.*, 2006).

*In vitro*, de nombreuses équipes ont montré une induction de la sénescence endothéliale par le « high glucose », c'est à dire en présence de concentrations élevées de glucose dans les milieux d'incubation. Hayashi *et al.*, ont montré que l'exposition des HUVEC à des concentrations élevées de glucose augmente l'activité SA- $\beta$ -gal et la production de ROS, et diminue l'activité de la télomérase. Ces effets ont été accompagnés par une diminution de l'expression de la eNOS et de la production endothéliale de NO. Tous ces effets sont prévenus par un traitement avec la L-arginine, la L- citrulline et des antioxydants (vitamine C et E) seuls ou en combinaison, ainsi que par la surexpression de la eNOS dans les CE transfectées, suggérant un rôle important du NO dans la prévention de la sénescence endothéliale au cours du diabète (Hayashi *et al.*, 2006). Les cellules endothéliales jeunes cultivées sur une matrice de collagène glyqué présentent une augmentation de l'activité SA- $\beta$ -gal et de l'expression de p53 sans raccourcissement des télomères ni diminution de l'activité de la télomérase. Ces effets sont associés à une diminution de la production de NO (malgré une augmentation de 3 fois de l'expression de la eNOS), et une augmentation des protéines modifiées par nitrotyrosine. Tous ces effets sont prévenus et inversés par un traitement antioxydant, ebselen ou un analogue de la superoxyde dismutase. Ces résultats indiquent que la réduction de la biodisponibilité du NO, l'excès de peroxyde nitrite et/ou des anions superoxyde observés dans le diabète sont à l'origine de la sénescence endothéliale prématurée induite par l'hyperglycémie (Chen *et al.*, 2002).

#### *II-4.1 Rôle du système angiotensine dans la sénescence induite par l'hyperglycémie*

Une méta-analyse de plusieurs essais cliniques a montré que l'inhibition du RAS a diminué le nombre d'inclusion de nouveaux patients diabétiques (Yusuf *et al.*, 2005 ; Abouissa *et al.*, 2005). De plus, des essais cliniques ont montré un effet CV bénéfique des IEC et des Sartans chez les diabétiques. Ainsi, il est possible que le système angiotensine soit impliqué dans le développement d'une dysfonction vasculaire cours du diabète.

Chen *et al.*, ont montré que l'exposition des CEs au high glucose (HG) augmente l'activité SA- $\beta$ -gal et le stress oxydant mitochondrial, accompagné par une surexpression de l'enzyme de conversion, et du récepteur AT-1 de l'Ang II. Le traitement des CEs par IEC (benazepril) ou Sartans (losartan) inhibe la sénescence et le stress oxydant mitochondrial induits par le HG, suggérant un rôle clé du système RAS dans la sénescence endothéliale induite par le glucose.

Ainsi, les effets délétères de l'hyperglycémie chronique sur la fonction vasculaire pourraient contribuer au développement des maladies cardiovasculaires (MCV) chez le diabétique.

### **III- Le diabète comme facteur de risque cardiovasculaire**

Selon l'IDF, les maladies cardiovasculaires sont responsables de 80% des décès des patients diabétiques (IDF Diabetes Atlas, 2014. 6<sup>ème</sup> édition). Le DT2 est donc un facteur de risque cardiovasculaire à part entière, multipliant le risque de mortalité CV d'un facteur de 3 à 7 (Stamler *et al.*, 1993). Une méta-analyse réalisée en 2004 a montré qu'une augmentation de 1% du taux d'hémoglobine glyquée (une mesure corrélée avec les taux moyens de glucose au cours des 2-3 mois précédents) est associée à une augmentation de 18% du risque d'événements cardiovasculaires (Selvin *et al.*, 2004), et une augmentation de 12% à 14% du risque de décès (Stratton *et al.*, 2000 ; Gerstein *et al.*, 2005).

Les analyses observationnelles des données de l'étude clinique UKPDS (UK Prospective Diabetes Study) ont fourni des renseignements quant à l'estimation du risque de complications macro et microvasculaires dans le DT2. Chaque réduction de 1% du taux d'hémoglobine glyquée était associée à une réduction de 21% du risque pour tout critère associé au diabète (IC 95% de 17% à 24%,  $P < 0,0001$ ), de 21% pour les décès liés au diabète (15 % à 27%,  $P < 0,0001$ ), de 14% pour l'infarctus du myocarde (8% à 21%,  $P < 0,0001$ ) et de 37% pour les complications microvasculaires (33% à 41%,  $P < 0,0001$ ). (Stratton *et al.*, 2000).

Cependant, les essais cliniques interventionnels évaluant le bénéfice CV d'un contrôle glycémique strict, se rapprochant le plus possible de la normo glycémie, chez les diabétiques, ont bousculé ces évidences jusque-là intangibles (cf. ci-dessous le détail des études).

## **IV- Impact du contrôle glycémique sur le risque cardiovasculaire**

Bien que les études observationnelles aient associé le contrôle glycémique au risque cardiovasculaire (Khaw *et al.*, 2004; Selvin *et al.*, 2004), les études interventionnelles n'ont pas permis de conclure sur le bénéfice d'un contrôle glycémique intensif versus un contrôle standard, sur la réduction du risque cardiovasculaire. Ces études ont été conduites dans le DT1 et DT2 en évaluant l'impact du contrôle glycémique intensif, à la fois, sur les complications micro vasculaires et macro vasculaires.

### ***IV-1 Chez les patients atteints de DT1***

#### ***IV-1.1 L'étude DCCT (Diabetes Control and Complications Trial)***

Cette étude a comparé l'impact d'un traitement conventionnel reposant sur 1 ou 2 injections d'insuline par jour avec une autosurveillance minimale, versus un traitement intensif visant à ramener la glycémie le plus proche possible de la normale, soit avec un traitement par injections multiples d'insuline, soit par injection sous-cutanée continue d'insuline à l'aide d'une pompe, dans la prévention des complications microvasculaires du diabète de type 1. Après 6 ans de suivi, les résultats de l'étude ont montré que dans la cohorte d'intervention primaire (patients avec une durée de diabète de 1 à 5 ans, sans rétinopathie ni albuminurie), la thérapie intensive a réduit le risque moyen du développement de la rétinopathie de 76% par rapport à la thérapie conventionnelle. Dans la cohorte d'intervention secondaire (patients avec une durée de diabète de 1 à 15 ans, présentant une rétinopathie et/ou une albuminurie), le traitement intensif a ralenti de 54% la progression de la rétinopathie et a réduit de 47% le développement de la rétinopathie proliférative ou non proliférative. Dans les deux cohortes combinées, une thérapie intensive a réduit l'apparition de microalbuminurie de 39%, celle de l'albuminurie de 54% et de neuropathie clinique de 60% (Nathan *et al.*, 1993). Ainsi, dans le DT1, le contrôle intensif de la glycémie réduit considérablement le développement et la progression des complications microvasculaires telles que la rétinopathie, la néphropathie et la neuropathie.

#### ***IV-1.2 L'étude EDIC (Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications)***

La totalité de la cohorte DCCT a participé à une étude observationnelle pendant 20 ans supplémentaires. Le suivi à long terme de ces patients a également démontré des effets bénéfiques sur les complications macrovasculaires, avec une réduction de risque de 42 % du critère cardio-vasculaire composite, comme en témoigne la diminution du CAC (coronary

artery calcification), un index évaluant l'athérosclérose, de 31,0% chez les patients traités initialement de façon conventionnelle versus 8,5% pour la thérapie intensive (Cleary *et al.*, 2006).

#### *IV-2 Chez les patients atteints de DT2*

Il existe également des données indiquant une réduction du risque de complications microvasculaires avec un contrôle glycémique intensif à long terme. Cependant, la démonstration dans les études interventionnelles du contrôle glycémique intensif sur la réduction des événements cardiovasculaires est plus controversée. Des essais randomisés axés sur les résultats cardiovasculaires, ont tenté de répondre clairement à la question, si le ciblage de la normoglycémie peut réduire le risque de maladie cardiovasculaire chez les diabétiques.

En effet, quatre essais cliniques majeurs ont évalué les effets du contrôle glycémique intensif par rapport aux soins standard sur le risque CV chez les patients atteints de DT2 : UKPDS (UK Prospective Diabetes Study), ACCORD (Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes), ADVANCE (Action in Diabetes and Vascular Disease), VADT (Veterans Affairs Diabetes Trial).

##### *IV-2.1 L'étude UKPDS (UK Prospective Diabetes Study)*

3867 patients atteints de DT2, nouvellement diagnostiqués, âgés de 54 ans en moyenne, présentant une glycémie à jeun entre 6,1-15,0 mmol/L, ont reçu une thérapie intensive avec des sulfonylurée (Chlorpropamide, Glibenclamide ou Glipizide) ou insuline, visant une glycémie à jeun <6 mmol/l, ou une thérapie conventionnelle avec des mesures diététiques seules visant une glycémie <15 mmol/l. Les hypoglycémifiants ont été ajoutés uniquement en cas d'hyperglycémie (supérieur à 15 mmol /l).

Trois critères de jugement étaient évalués :

- Tout critère associé au diabète (mort subite, décès par hyperglycémie ou hypoglycémie, IDM, AVC, angine de poitrine, insuffisance cardiaque, insuffisance rénale, amputation, rétinopathie nécessitant photocoagulation, cécité ou cataracte).
- Décès lié au diabète
- Mortalité toutes causes confondues.

Après 10 ans de suivi, l'HbA1c était de 7,0% dans le groupe intensif versus 7,9% dans le groupe conventionnel soit une réduction de 11%. Les résultats montrent une réduction de 12% (IC

95%. 1-21. P=0,029) pour tout critère associé au diabète; 10% (IC 95% -11 à 27. P=0,34) pour décès liée au diabète; et de 6% (IC 95% -10 à 20. P=0,44) pour mortalité toutes causes confondues. La réduction du risque dans le premier critère de jugement est principalement due à une réduction du risque de 25% des complications microvasculaires (7-40. P=0,0099) et une réduction de 16 % (P = 0,052) du risque de survenue d'un infarctus du myocarde.

*La conclusion de cette étude est que le contrôle intensif de la glycémie par sulfonylurées ou insuline diminue considérablement le risque des complications microvasculaires, mais pas macrovasculaires chez les patients atteints de DT2 malgré une réduction de 16% de l'infarctus du myocarde qui était juste inférieur à la signification statistique (P = 0,052). Par ailleurs, aucun des médicaments n'a eu un effet aggravant des maladies cardiovasculaires. Toutefois, les traitements intensifs ont augmenté le risque d'hypoglycémie (UKPDS, Lancet 1998).*

La cohorte de l'étude UKPDS a participé à une étude de suivi post-thérapeutique pendant 10 ans, afin d'examiner la persistance de l'amélioration du contrôle glycémique et du bénéfice sur les conséquences macrovasculaires.

Les résultats montrent que la différence entre les deux groupes dans les niveaux d'hémoglobine glyquée a été perdue après la première année. Dans le groupe intensif, des réductions du risque relatif du critère de jugement principal à savoir tout critère associé au diabète, ont persisté 10 ans après (9%, P=0,04). Cependant, de nouveaux effets ont émergé: une réduction des maladies microvasculaires (24%, P= 0,001), du risque pour l'infarctus du myocarde (15%, P=0,01) et du décès toute causes confondues (13%, P=0,007). Dans le sous-groupe de patients en surpoids traités par Metformine, des réductions significatives du risque ont persisté pour tout point lié au diabète (21%, P = 0,01), infarctus du myocarde (33%, P = 0,005) et décès par cause cardiovasculaire (27%, P = 0,002).

*Ainsi, malgré une perte précoce de la différence glycémique entre les deux groupes (traitement intensif ou non), une réduction du risque microvasculaire a persisté et une réduction du risque d'IDM et de la mortalité toute cause, ont émergé après 10 ans chez les patients sous traitement intensif.*

#### *IV-2.2 L'étude ACCORD (Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes)*

10 251 patients atteints de DT2 présentant un risque élevé d'événements cardiovasculaires en raison de facteurs de risque CV ou d'événements CV antérieurs, âgés de 62,2 ans en moyenne, et présentant un taux d'hémoglobine glyquée (HbA1c) à jeun de 8,1%, ont reçu une thérapie intensive ciblant une HbA1c <6,0% ou une thérapie standard ciblant une HbA1c de 7,0 à 7,9 %. Tous les patients du groupe intensif ont commencé par au moins deux classes d'agents hypoglycémiant, puis, les doses sont intensifiées ou une nouvelle classe de médicament est ajoutée chaque mois si les niveaux d'HbA1c sont supérieurs à 6%. Les antidiabétiques utilisés sont : le glimépiride (une sulfonylurée), le repaglinide (un insulino-sécrétagogue à action rapide), la Metformine (une biguanide), la rosiglitazone (une thiazolidinedione), l'acarbose (un inhibiteur de l' $\alpha$ -glucosidase) et l'insuline à action prolongée ou à action plus courte. La stratégie hypoglycémiant du groupe standard était assurée par des mesures diététiques et/ou traitement pharmacologique si HbA1c  $\geq$  8%.

L'étude ACCORD est axée sur les niveaux de glycémie atteints, et non sur la nature des thérapies utilisées pour atteindre ces niveaux (toutes les combinaisons sont autorisées), l'étude n'est pas conçue pour tester une approche anti hyperglycémique contre une autre comme c'était le cas dans UKPDS. 35% des patients avaient déjà eu un événement cardiovasculaire.

Le critère de jugement principal est un critère composite (MACE) regroupant

- L'apparition d'un infarctus du myocarde non fatal,
- L'apparition d'un accident vasculaire cérébral non fatal,
- Décès dus à des causes cardiovasculaires.

Un an après la randomisation, des taux d'hémoglobine glyquée stables de 6,4% et de 7,5% ont été atteints dans le groupe intensif et le groupe standard respectivement ce qui fait une réduction de 14,6%.

Après 3 ans et demi de suivi, la découverte d'une mortalité plus élevée dans le groupe de thérapie intensive a entraîné une interruption du traitement intensif, 17 mois avant la fin prévue de l'étude. 257 patients dans le groupe intensif sont décédés, versus 203 patients dans le groupe standard (HR : 1,22; IC à 95%, 1,01 à 1,46; P = 0,04). De plus, le taux d'épisodes hypoglycémiques nécessitant une assistance médicale était de 3,1% et de 1,0% ainsi qu'un gain de poids moyen de 3,5 kg et de 0,4 kg dans le groupe intensif et standard respectivement (P <0,001). Le critère primaire composite CV n'a pas été atteint, avec une réduction non significative de 10% (HR : 0,90, IC 95% : 0,78-1,04. P=0,16). Néanmoins, l'analyse en sous-



groupe a montré que le critère primaire était significativement réduit chez deux types de patients : ceux avec un déséquilibre glycémique modéré à l'inclusion (HbA1c < 8,0%) et ceux en prévention primaire CV. Il est également important de souligner que les IDM non fatals étaient significativement réduits de 24% dans le bras intensif (HR : 0,76, IC 95% : 0,62-0,92. P=0,004). *La conclusion de cette étude est que l'utilisation d'un traitement intensif pour cibler les taux d'hémoglobine glyquée normales pendant 3,5 ans a augmenté la mortalité et n'a pas réduit considérablement les événements cardiovasculaires majeurs. Ces résultats identifient un préjudice précédemment non reconnu de la réduction intensive du glucose chez les patients à haut risque atteints de diabète de type 2 (Gerstein et al., 2008) cf. paragraphe suivant).*

#### *IV-2.3 L'étude ADVANCE (Action in Diabetes and Vascular Disease)*

11140 patients atteints de diabète de type 2 avec un historique de maladie macrovasculaire ou microvasculaire majeure, ont été randomisés pour subir un contrôle standard ou intensif de la glycémie, par l'utilisation de gliclazide plus autres médicaments nécessaires pour obtenir une HbA1c inférieure ou égale à 6,5%. Le critère de jugement primaire est un composite d'événements macrovasculaires majeurs (décès dus à des causes cardiovasculaires, d'IDM non fatal ou AVC non fatal) et des événements microvasculaires majeurs (néphropathie ou rétinopathie), évalués conjointement et séparément.

Après un suivi de 5 ans, les taux d'HbA1c étaient de 6,5% dans le groupe de contrôle intensif, versus 7,3% dans le groupe standard. Le contrôle intensif a réduit l'incidence des événements macrovasculaires et microvasculaires majeurs combinés (18,1% versus 20,0% pour le contrôle standard (HR, 0,90, CI 95%, 0,82 à 0,98; P=0,01), ainsi que des événements microvasculaires majeurs (9,4% contre 10,9%) (RR, 0,86; IC à 95%, 0,77 à 0,97; P=0,01), principalement en raison d'une réduction de l'incidence de néphropathie (4,1% contre 5,2%, HR 0,79; IC à 95%, 0,66 à 0,93; P = 0,006), sans effet significatif sur la rétinopathie (P = 0,50). Il n'y avait aucun effet significatif du contrôle glycémique sur les événements macrovasculaires majeurs (RR, 0,94; IC à 95%, 0,84 à 1,06; P=0,32), décès par causes cardiovasculaires (RR, 0,88; IC à 95%, 0,74 à 1,04; P= 0,12), ou décès toute cause (RR, 0,93; IC à 95%, 0,83 à 1,06; P = 0,28). Une hypoglycémie grave était plus fréquente dans le groupe contrôle intensif (2,7% versus 1,5% dans le groupe standard (HR1,86; IC à 95%, 1,42 à 2,40; P <0,001).

*La conclusion de cette étude est que 5 ans de contrôle intensif de la glycémie a entraîné une réduction relative de 10% dans le critère composite incluant les événements macrovasculaires et microvasculaires majeurs, principalement en raison d'une réduction relative de 21% de la néphropathie, sans réduction des événements macrovasculaires majeurs. Ces résultats contrastent avec l'excès de mortalité signalé dans l'étude ACCORD, bien que des niveaux similaires de glycémie ont été atteints avec le contrôle intensif.*

#### *IV-2.4 L'étude VADT (Veterans Affairs Diabetes Trial)*

Elle concerne 1791 anciens combattants militaires atteints de DT2 mal contrôlé (HbA1c à 9.4%) diagnostiqué depuis 11,5 ans en moyenne, qui avaient une réponse insuffisante aux doses maximales d'un agent oral ou d'un traitement par insuline, âgés de 60,4 ans en moyenne, ont été randomisés pour recevoir une thérapie intensive ou standard. L'objectif du groupe intensif était une réduction absolue de 1,5 % du taux d'HbA1c par rapport au groupe de thérapie standard. Dans les deux groupes d'étude, les patients avec un indice de masse corporelle (IMC) de 27 ou plus, ont commencé par deux agents oraux (Metformine et rosiglitazone); Ceux avec un IMC <27 ont commencé par glimépiride et rosiglitazone. L'insuline a été ajoutée pour le groupe intensif si HbA1c supérieure à 6% et ceux du groupe standard si HbA1c supérieure à 9%. D'autres facteurs de risque cardiovasculaire ont été traités uniformément. 40% des patients avaient déjà eu un événement cardiovasculaire.

Le critère de jugement primaire était la durée depuis la randomisation jusqu'à la première incidence d'un événement cardiovasculaire majeur (IM, AVC, décès dus à des causes cardiovasculaires, une insuffisance cardiaque congestive, une chirurgie pour une maladie vasculaire, une maladie coronarienne inopérable et une amputation pour la gangrène ischémique).

Après 5,6 ans de suivi, les taux d'HbA1c étaient stabilisés à 8,4% dans le groupe standard et 6,9% dans le groupe intensif. Ce résultat a atteint l'objectif pré-spécifié d'une différence absolue entre les groupes de 1,5%. Le critère de jugement principal s'est produit chez 264 patients du groupe standard versus 235 patients dans le groupe intensif (HR0,88; IC 95%, 0,74 à 1,05; P=0,14). Il n'y avait donc aucune différence significative entre les deux groupes dans le critère primaire composite, ni dans le taux de décès toute cause (RR, 1,07, IC à 95%, 0,81 à 1,42, P=0,62). Aucune différence entre les deux groupes n'a été observée pour les complications

microvasculaires. Les taux d'événements indésirables, principalement l'hypoglycémie, étaient de 17,6% dans le groupe standard versus 24,1% dans le groupe intensif.

*La conclusion de cette étude est que le contrôle intensif de la glycémie chez les patients atteints d'un diabète de type 2 mal contrôlé n'a eu aucun effet significatif sur les taux d'événements cardiovasculaires majeurs, de décès ou de complications microvasculaires, à l'exception de la progression de l'albuminurie après 5,6 ans (P = 0,01) (Duckworth et al., 2009).*

Study	Baseline HbA <sub>1c</sub> Control vs intensive	Mean duration of diabetes at baseline (years)	Microvascular		CVD		Mortality	
UKPDS	9% → 7.9% vs 7%	Newly diagnosed	↓	↓	↔	↓	↔	↓
ACCORD	8.3% → 7.5% vs 6.4%	10.0	↓*		↔		↑	
ADVANCE	7.5% → 7.3% vs 6.5%	8.0	↓	↔**	↔	↔	↔	↔
VADT	9.4% → 8.4% vs 6.9%	11.5	↓	?	↔	↓	↔	↔

Long-term follow-up

**Figure 13 : Résumé des études cliniques concernant le contrôle glycémique et le risque cardiovasculaire**

### V- L'hyperglycémie et les facteurs de risque CV sont à l'origine des macroangiopathies diabétiques

Le diabète est très souvent associé à d'autres facteurs de risque cardiovasculaire tels que l'hypertension ou la dyslipidémie. La dysfonction et la sénescence endothéliale observée dans les macro et microvaisseaux chez les diabétiques sont d'une part la conséquence des atteintes dues à des mécanismes propres au diabète à savoir l'hyperglycémie mais également aux autres facteurs de risque CV.

L'ensemble de ces facteurs joue un rôle d'amplification sur le risque d'apparition de maladies CV. En effet, l'étude MRFIT (Multiple Risk Factor Intervention Trial) réalisée dans une cohorte de 347 978 personnes a évalué l'effet du diabète seul, et en combinaison à d'autres facteurs de risque CV sur la mortalité due aux maladies cardiovasculaires (MCV). Les résultats ont montré que le risque absolu de décès par MCV était environ 3 fois plus élevé chez le diabétique que chez le non-diabétique, et que ce risque augmentait au fur et à mesure qu'on combinait les

facteurs de risque CV (cholestérol supérieur à 200 mg/dl, tabagisme et PAS supérieure à 120 mmHg) (Stamler *et al.*, 1993).

Par conséquent, la prise en charge thérapeutique du diabétique doit non seulement prendre en compte l'équilibre glycémique mais aussi les facteurs de risque CV associés au diabète. L'étude observationnelle britannique UKPDS a démontré qu'une diminution de la pression artérielle systolique de 10 mm Hg était associée à une baisse de 15% de mortalité chez les diabétiques (Adler *et al.*, 2000). De plus, l'étude interventionnelle ADVANCE a montré qu'une réduction de 5,6 mm Hg de la pression artérielle systolique chez les patients diabétiques recevant une association de perindopril et indapamide, a entraîné une réduction de 9% des événements macro et microvasculaires majeurs, par rapport à ceux qui ont reçu un placebo (Patele *et al.*, 2005).

Enfin, comparativement au placebo, l'étude CARDS (Collaborative Atorvastatin Diabetes Study) évaluant l'efficacité d'un traitement par Atorvastatine (hypolipémiant) en termes de prévention des événements cardiovasculaires majeurs chez des diabétiques de type 2 sans antécédents cardiovasculaires et sans élévation importante du LDL-cholestérol, a montré une diminution de 37% (IC 95 %: - 52 à - 17 ; p = 0,001) du risque d'événements cardiovasculaires majeurs et de 27% (IC 95 %: - 48 à +1 ; p = 0,059) de la mortalité toute causes confondues (Colhoun *et al.*, 2004).

C'est dans ce contexte que l'étude clinique Steno-2 a été réalisée.

### ***V-1 L'étude Steno-2 (Effect of a Multifactorial Intervention on Mortality in Type 2 Diabetes)***

Cette étude a comparé l'effet d'une intervention multifactorielle ciblant les facteurs de risque CV modifiables en plus de l'intensification de la glycémie, versus un traitement conventionnel, sur le risque cardiovasculaire chez les patients atteints de DT2, sur une durée de suivi moyenne de 7,8 ans.

160 patients âgés de 55 ans en moyenne, ont été randomisés pour recevoir une thérapie conventionnelle ou une thérapie intensive (mesures diététiques stricts, gliclazide ou insuline, ou Metformine chez des patients en surpoids) avec une prise en charge individuelle des différents facteurs de risque tels que l'hypertension, la dyslipidémie et la microalbuminurie, ainsi qu'une prévention secondaire des MCV avec l'aspirine. Un supplément vitamino-minéral (vitamine C,  $\alpha$ -tocophérol, acide folique, et picolinate de chrome) a été administré.

Le critère de jugement primaire était un critère composite incluant le décès par causes cardiovasculaires, IDM non fatal, AVC non fatal, revascularisation et amputation.

Les résultats montrent que la baisse des valeurs d'HbA1c, de pression artérielle systolique et diastolique, des taux de cholestérol sérique et de triglycérides, mesurés à jeun, ainsi que le taux d'excrétion d'albumine urinaire, étaient significativement plus importante dans le groupe de thérapie intensive comparé au groupe de thérapie conventionnelle. Les patients recevant une thérapie intensive ont également eu un risque significativement plus faible d'évènements cardiovasculaires (HR, 0,47; IC à 95%, 0,24 à 0,73), de néphropathie (HR, 0,39; IC à 95%, 0,17 à 0,87), de rétinopathie (HR, 0,42; IC à 95%, 0,21 à 0,86) et de neuropathie (HR, 0,37; IC à 95%, 0,18 à 0,79).

*La conclusion de cette étude est qu'une intervention axée sur l'intensification de la glycémie, tout en visant multiples facteurs de risque chez les patients atteints de diabète de type 2 et de microalbuminurie réduit de près de 50% le risque d'évènements cardiovasculaires et microvasculaires (Gaede et al., 2003).*

Les patients de l'étude Steno-2 ont ensuite été suivis de manière observationnelle pendant 5,5 ans. Le critère de jugement primaire était le moment de mourir pour toute cause confondue. Après 13,3 ans de suivi, 24 patients dans le groupe de traitement intensif sont décédés, versus 40 dans le groupe de thérapie conventionnelle (HR, 0,54; IC à 95%, 0,32 à 0,89; P=0,02). La thérapie intensive a été associée à un risque moins élevé de mortalité cardiovasculaire (HR, 0,43; IC 95%, 0,19 à 0,94; P = 0,04) et des évènements cardiovasculaires (HR, 0,41; IC à 95%, 0,25 à 0,67; P <0,001). Un patient du groupe de thérapie intensive a eu une maladie rénale de progression vers une phase terminale, comparativement à six patients du groupe de traitement conventionnel (P = 0,04). Moins de patients dans le groupe de thérapie intensive ont nécessité une photocoagulation de la rétine (risque relatif, 0,45; IC à 95%, 0,23 à 0,86; P = 0,02). Peu d'effets secondaires majeurs ont été signalés (Gaede et al., 2008).

*La conclusion de cette étude est que chez les patients de diabète de type 2 à haut risque CV, une intervention intensive, à long terme, de la glycémie, combinée à la prise en charge multiple des facteurs de risque, a eu des effets bénéfiques sur les complications vasculaires et sur les taux de mortalité pour cause cardiovasculaire ou toutes causes confondues.*

**En résumé de l'ensemble des études**, seuls les résultats de l'étude UKPDS étaient en faveur d'une réduction du risque d'événements CV avec un contrôle glycémique intensif, bénéfique vraisemblablement expliqué par plusieurs facteurs: sujets jeunes avec un DT2 récent, plus longue durée de suivi et un objectif glycémique parfois différent de celui des autres études. Les résultats de l'étude VADT avaient montré que le risque d'événements CV majeurs était comparable dans les deux groupes. Néanmoins, une tendance à l'augmentation des décès CV dans le bras intensif a été observée (38 vs 29, NS). Concernant l'essai ACCORD, l'étude a été prématurément interrompue après à la demande du comité de surveillance indépendant, en raison d'une surmortalité dans le bras intensif. Les raisons de cette surmortalité demeurent incertaines, même si les hypoglycémies sévères ont été suspectées. Dans l'étude ADVANCE, le critère primaire composite de survenue d'événements microvasculaires et macrovasculaires a été atteint dans le groupe intensif. Cependant, aucune réduction significative des événements CV majeurs n'a été observée. Un taux d'hypoglycémie grave était significativement plus élevé dans le bras intensif sans être associé à une surmortalité. L'étude STENO-2 a clairement montré qu'une prise en charge multiple des facteurs de risque CV, en plus du contrôle intensif de la glycémie diminue de façon significative les événements CV majeurs ainsi que la mortalité globale.

Ainsi, les données discordantes concernant le lien entre le risque CV et la cible glycémique ne permettent pas de répondre à la question : le contrôle glycémique réduit-il indépendamment les complications cardiovasculaires ? Bien que les observations épidémiologiques aient montré une association positive entre l'augmentation de l'HbA1c et le risque CV.

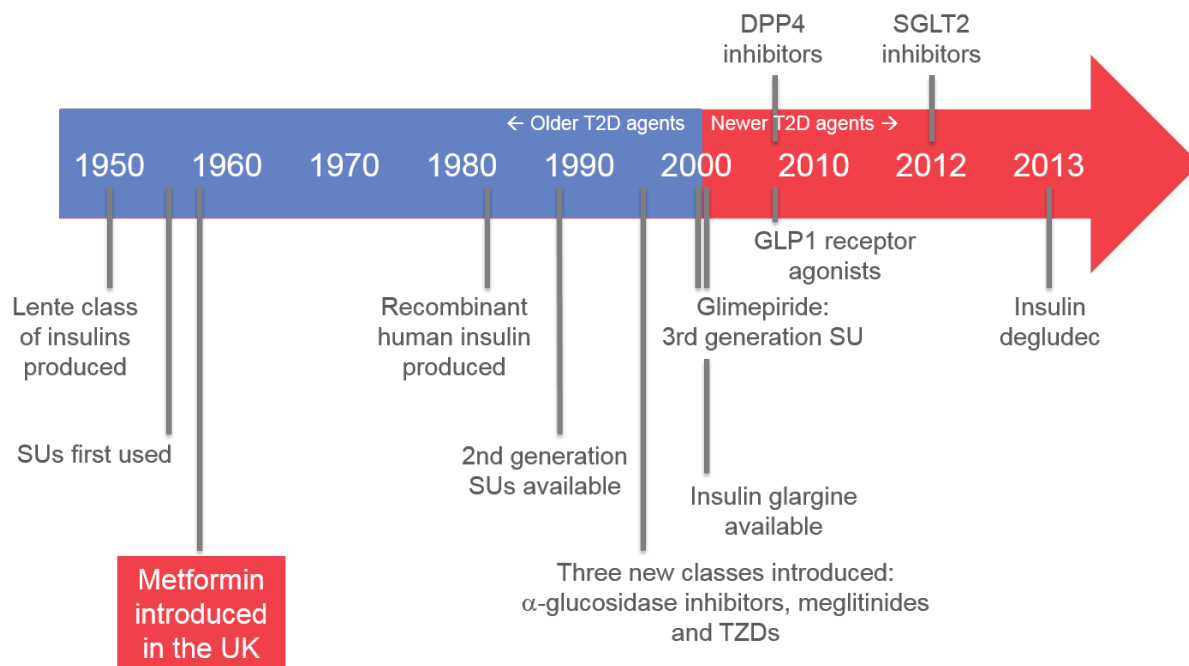
Les essais randomisés prenant en charge un facteur de risque unique à savoir la glycémie chez les diabétiques, ont démontré des avantages en termes de complications microvasculaires mais pas macrovasculaires. Seul la prise en charge multiple des facteurs de risque CV, a permis un bénéfice cardiovasculaire.

C'est pourquoi, l'analyse des 4 études d'intervention publiées en 2008 ont conduit à une modification des recommandations concernant la prise en charge du DT2 détaillées ci-dessous.

## VI- Nouvelles exigences des autorités sanitaires dans la prise en charge du DT2

Suite à la publication des résultats des études cliniques interventionnelles citées ci-dessus, et suite à la controverse sur l'élévation des événements cardiovasculaires par la rosiglitazone, un anti diabétique de la famille thiazolidinedione qui a été associée à une augmentation significative du risque d'IDM (HR : 1,43 ; CI à 95%, 1,03 à 1,98; P = 0,03) et à une augmentation du risque de mortalité cardiovasculaire avec une signification limite (HR : 1,64 (IC à 95%, 0,98 à 2,74; P = 0,06) (Steven *et al.*, 2007), les autorités sanitaires à savoir la Food and Drug Administration (FDA) en 2008 et l'European Medicines Agency (EMA) en 2012, ont mis en place de nouvelles directives pour établir **la sécurité** des nouveaux médicaments antidiabétiques et garantir leur **innocuité** sur le plan cardiovasculaire. Ils ont exigé que tout programme de développement d'un nouveau médicament antidiabétique fasse l'objet d'études cliniques démontrant que le traitement n'entraînera pas d'augmentation inacceptable du risque cardiovasculaire, en exigeant de nouvelles modalités:

- **Les événements CV importants doivent être analysés.** Ces événements devraient inclure la mortalité CV, l'IDM, l'AVC et éventuellement l'hospitalisation pour syndrome coronarien aigu, des procédures urgentes de revascularisation.
- **Les populations à haut risque doivent être incluses,** tels que les patients atteints de maladies relativement avancées, les patients âgés, et les patients présentant un certain degré d'insuffisance rénale. En effet, ces patients sont susceptibles d'être traités avec le médicament antidiabétique s'il est approuvé.
- **Des données à long terme sont requises ( $\geq 2$  ans)** Il est probable que les essais devront durer plus longtemps que la durée habituelle de 3 à 6 mois pour observer une proportion suffisante d'événements et fournir des données sur le risque CV à plus long terme, indispensable pour ces traitements utilisés au long cours.



**Figure 14 : schéma du développement des antidiabétiques, source PACE-CME.org**

### *VI-1 Les anciens antidiabétiques et protection cardiovasculaire*

La plupart des thérapeutiques antidiabétiques de 1<sup>ère</sup> génération incluant la Metformine, les sulfonurées et les thiazolidinediones n'ont pas fait l'objet d'investigations cliniques où le critère de jugement principal comprenait la survenue d'évènements cardiovasculaires fatals ou non (Paredes *et al.*, 2016). Certaines études ont toutefois montré une augmentation des évènements cardiovasculaires chez les patients DT2 traités par sulfonurées (Meinert *et al.*, 1970 ; Engler *et al.*, 1996 ; Bell *et al.*, 2006).

L'étude UGDP a montré chez les sujets traités avec tolbutamide, une sulfonurée de 1<sup>ère</sup> génération, un taux de mortalité cardiovasculaire significativement plus élevé que dans le groupe traité un placebo. La cause est probablement liée à au mécanisme d'action des sulfonurées qui se lient à la sous-unité SUR des canaux potassiques ATP-dépendants des cellules  $\beta$  pancréatiques, ce qui maintient les canaux fermés. Cela provoque un afflux calcique favorisant la libération accrue d'insuline (Boyd *et al.*, 1990). Malheureusement, certaines sulfonurées, selon leur affinité, se lient aussi aux canaux potassiques présents dans les cardiomyocytes et les cellules musculaires lisses vasculaires. La fermeture de ces canaux altère le pré-conditionnement ischémique, un mécanisme adaptatif des cardiomyocytes aux brèves périodes d'ischémie permettant leur survie (Leibowitz *et al.*, 1996). D'autres explications



également plausibles pour la toxicité de la sulfonylurée comprennent les effets arythmogènes directs, le gain de poids, l'hypoglycémie et la toxicité des taux élevés d'insuline.

Deux grandes études de cohortes (Johnson *et al.*, 2002 ; 2005) ont montré que l'utilisation de la Metformine par des patients atteints de DT2 nouvellement diagnostiqués, était associée à une réduction du risque de morbidité et de décès, par rapport à la monothérapie par sulfonylurée. Toutefois, il reste à savoir si la relation observée résulte d'un effet protecteur lié à la Metformine ou d'un effet potentiellement néfaste lié aux sulfonylurées (Bell *et al.*, 2004). Une étude rétrospective réalisée par Simpson et ses collègues sur 5795 diabétiques, où 120 utilisaient exclusivement une sulfonylurée de 1<sup>ère</sup> génération, 4138 sous glyburide (sulfonylurée récente) en monothérapie et 1537 sous Metformine en monothérapie, pour une durée moyenne de suivi de 4,8 ans. Le groupe de sujets exposés à des taux plus élevés de sulfonylurée avaient une mortalité supérieure (sulfonylurées de 1<sup>ère</sup> génération : HR : 2,1, CI à 95% 1,0-4,7 et glyburide : HR 1,3, CI 95 % 1.2-1.4). En revanche, la Metformine n'a eu aucun effet apparent sur la mortalité (HR 0.8, IC 95% 0,7-1,1) (Simpson *et al.*, 2006).

De plus, il est important de rappeler que dans l'étude ADVANCE, les hypoglycémies sévères étaient associées à une augmentation significative des événements et de la mortalité cardiovasculaire. Or, les sulfonylurées sont connues pour augmenter le risque d'hypoglycémie du fait de leur effet de stimulateur de sécrétion d'insuline.

Malgré ces observations, les sulfonylurées restent un pilier de la thérapie antidiabétique depuis 40 ans (Groop *et al.*, 1992). De manière intéressante, il faut souligner que leur effet délétère n'a pas été observé dans les études UKPDS, ADVANCE et ACCORD, au contraire, le traitement intensif avec le Glibenclamide a montré une réduction des événements microvasculaires.

**En résumé**, les études actuelles ne permettent pas de certifier les capacités de prévention voire de l'innocuité cardiovasculaire des sulfonylurées. Les résultats d'une étude en cours (CAROLINA: glimépiride vs linagliptine), sont attendus pour apporter de nouveaux éléments et répondre à la question de l'impact des sulfonylurées sur le statut cardiovasculaire des patients DT2.

## *VI-2 Les antidiabétiques de nouvelle génération et protection cardiovasculaire*

Plus récemment, de nouvelles classes d'agents antidiabétiques ciblant le système incrétine ont été développés : les analogues du Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) (exénatide, liraglutide, dulaglutide), et les inhibiteurs de dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) (les gliptines).

### *VI-2.1 Les incrétinomimétiques*

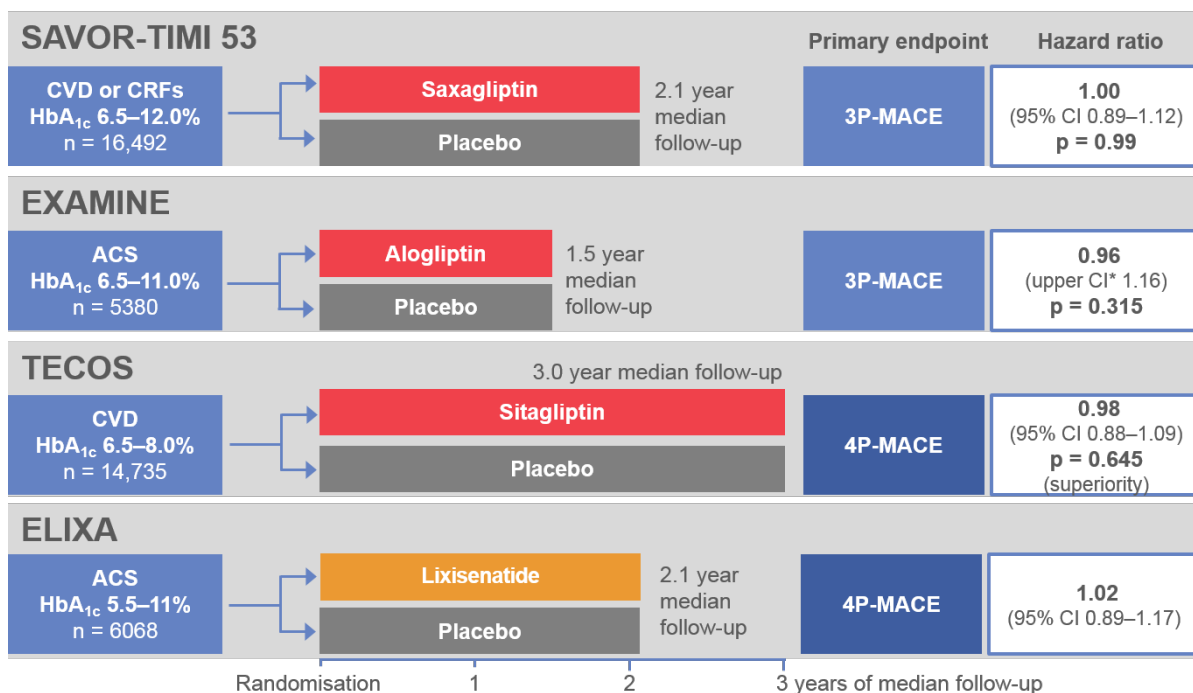
Le GLP-1 est une hormone sécrétée par les cellules L intestinales en réponse à la prise alimentaire afin de stimuler la sécrétion d'insuline et diminuer la concentration du glucose sanguin. Cet effet incrétine a été mis en évidence lorsque l'on a observé que la prise orale de glucose provoque une plus grande réponse insulinaire que ne le fait le glucose par voie intraveineuse, suggérant ainsi l'existence d'un facteur intestinal pouvant augmenter la sécrétion d'insuline post-prandiale. L'effet incrétine correspond au différentiel de la sécrétion d'insuline induite par une prise orale de glucose par rapport à celle induite par une administration intraveineuse, entraînant la même élévation de la glycémie. Le GLP-1 agit de manière dépendante du glucose en augmentant la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  et en réduisant simultanément la sécrétion du glucagon (hormone hyperglycémisante) par les cellules  $\alpha$  pancréatiques. Cet effet glucose-dépendant a pour avantage de limiter le risque d'hypoglycémie.

Chez les diabétiques, la sécrétion du GLP-1 est diminuée tandis que son action est préservée, ce qui fait du récepteur du GLP-1 une cible intéressante dans le traitement du DT2. Parce que le GLP-1 présente un temps de demi-vie très court et est rapidement dégradé en amide GLP-1 inactive par l'enzyme DPP-4 (Hui *et al.*, 2002), deux stratégies ont été adoptées dans le développement pharmacologique des analogues du GLP-1 afin d'augmenter la stabilité du GLP-1 et promouvoir l'effet incrétine. La première vise à créer des analogues structuraux du GLP-1 avec une durée de vie plus élevée, la deuxième à inhiber l'activité de DPP-4.

Malgré les deux effets bénéfiques des analogues du GLP-1, l'effet incrétine et également la croissance et la survie des cellules  $\beta$ , l'étude **TECOS** (Trial Evaluating Cardiovascular Outcomes with Sitagliptin) a montré que l'administration de Sitagliptine, inhibiteurs de DPP-4 n'a pas conduit à une réduction de la mortalité CV chez les DT2 (Green *et al.*, 2015). L'étude **SAVOR-TIMI** (Saxagliptin Assessment of Vascular Outcomes Recorded in Patients with Diabetes Mellitus) a également montré l'absence de protection CV d'un traitement par

Saxagliptine. De plus, un risque d'insuffisance cardiaque après un traitement par Saxagliptine a été rapporté dans (Ferrannini *et al.*, 2015).

A l'inverse, un traitement par analogues du GLP-1, a récemment montré un bénéfice cardiovasculaire. L'étude **LEADER** a évalué le retentissement cardiovasculaire du Liraglutide chez 9 340 patients d'âge médian 64 ans, diabétiques depuis 12,7 ans, mal contrôlés (HbA1c initiale à 8,7%) et à haut risque cardiovasculaire. Les patients ont été randomisés en deux bras : Liraglutide injectable (1,8 mg/j) versus placebo sur une durée de suivi de 3,8 ans. Le critère de jugement principal était les événements cardiovasculaires majeurs (MACE) : mort d'origine cardiovasculaire, IDM non fatal et AVC non fatal. Les critères secondaires comportent un autre critère composite comprenant en plus des éléments précédents la revascularisation coronaire, l'hospitalisation pour angor instable ou insuffisance cardiaque et la mortalité toutes causes confondues. Le critère de jugement principal est survenu moins souvent dans le bras Liraglutide (608 patients, 13,0 %) que dans le groupe placebo (694 patients, 14,9 %) : soit un risque relatif de 0,87 ; IC95%, 0,78-0,97 ; P = 0,01. Cet effet semble être principalement lié à la réduction significative de la mortalité (8,2 % versus 9,6 %, RR 0,85 : 0,74-0,97, p = 0,02) et en particulier de la mortalité cardiovasculaire (219 patients, 4,7%) versus (278 patients, 6,0%) dans le groupe placebo (RR, 0,78; IC 95%, 0,66 à 0,93; P = 0,007) (Marso *et al.*, 2016). Cependant, cet effet demeure relativement modéré. De plus, l'étude **ELIXA**, comparant l'effet du Lixisénatide, (analogue du GLP1 de structure différente du Liraglutide), versus placebo, n'avait pas montré de bénéfice cardiovasculaire chez des patients diabétiques ayant présenté un événement coronaire récent (Pfeffer *et al.*, 2015).



ACS, acute coronary syndrome; CRF, chronic renal failure; CVD, cardiovascular disease

**Figure 15: Résumé des études cliniques concernant les incrétinomimétiques et protection cardiovasculaire**

Suite à ces constats, la recherche de nouveaux traitements antidiabétiques plus protecteurs du système CV, restait un enjeu pour prévenir les complications liées au diabète et correspond à un besoin de santé publique.

### *VI-2.2 Une nouvelle classe d'antidiabétiques : les gliflozines, inhibitrices des transporteurs SGLT2*

Une nouvelle classe de composés antidiabétiques a été mise sur le marché dans certains pays, en 2012 : les inhibiteurs de SGLT2 (sodium glucose co-transporter-2) encore appelés gliflozines. Il existe actuellement trois médicaments de cette classe approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) et l'Agence européenne des médicaments (EMA): Canagliflozine, Dapagliflozine et Empagliflozine. Certains sont sur la marché japonais (Ipragliflozine, Luseogliflozine et tofogliflozine) et plusieurs autres sont en cours de développement (Ertugliflozine, Remogliflozine, et Sotagliflozine). Ces molécules agissent sur l'homéostasie du glucose en inhibant sa réabsorption au niveau rénal. Les inhibiteurs des SGLT2 offrent une nouvelle option dans le traitement du DT2, car elles sont la première classe d'agents antidiabétiques qui permettent l'élimination du glucose à l'extérieur de l'organisme.

## VII- Les transporteurs de glucose

L'homéostasie du glucose est assurée en grande partie par l'absorption de glucose à partir des glucides alimentaires dans l'intestin grêle et par sa filtration et réabsorption dans le rein. La bicouche lipidique des membranes cellulaires étant imperméable à cette molécule hydrophile, des protéines de transport spécialisées sont nécessaires à son passage du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire.

Deux type de transporteurs de glucose, les GLUTs et les SGLTs sont connus. Au moins 14 GLUTs et 12 SGLTs ont été identifiés (Wright *et al.*, 2011).

### VII-1 Les GLUTs (*glucose transporter*)

Cette famille de protéines facilite passivement le transport du glucose selon son gradient de concentration et par conséquent, ne consomment pas d'énergie : on parle de diffusion facilitée. Les protéines GLUT sont codées par le gène *SLC2A* qui codifie 12 protéines GLUT et la protéine HMIT1 chez l'homme, dont la distribution tissulaire n'est pas uniforme. Les exemples connus incluent le transport du glucose médié par GLUT1 à travers les CEs de la barrière hémato-encéphalique, le transport du glucose médié par GLUT2 à partir de l'épithélium intestinal, l'épithélium tubulaire rénal et les hépatocytes vers le sang, et le transport insulino-dépendant du glucose médié par GLUT4 dans le muscle squelettique.

### VII-2 Les SGLTs

Les SGLTs (sodium glucose co-transporter) transportent le glucose à travers les membranes cellulaires contre son gradient de concentration. Il s'agit d'un transport actif, dit secondaire, qui utilise l'énergie créée par un gradient de sodium. Il faut noter que le gradient de sodium, lui, est maintenu par la pompe  $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{ATPase}$  et stabilise le potentiel membranaire.

Les caractéristiques et la compréhension du mode d'action moléculaire des SGLTs ont été largement étudiées par le laboratoire de Wright et collègues, qui, au début des années 1980, ont décrit pour la première fois, l'existence d'un co-transporteur de glucose couplé au sodium pouvant être inhibé par la phlorizine, une substance naturelle utilisée comme outil de recherche pour induire une glycosurie rénale. En 1987, Wright et ses collègues ont cloné le SGLT1 chez le lapin.

### VII-2.1 Le SGLT1

C'est une protéine codée par le gène *SLC5A1* (Hediger *et al.*, 1987) qui transporte le D-glucose et le D-galactose avec une affinité similaire ( $K_m=0,5$  mmol/l) (Diez-Sampedro *et al.*, 2001b ; Hummel *et al.*, 2011) et avec une stœchiométrie de  $2 \text{ Na}^+ / 1$  sucre (Chen *et al.*, 1995). Le SGLT1 est principalement exprimé dans la membrane apicale des cellules épithéliales de la bordure en brosse de l'intestin grêle, et dans le segment S3 du tubule proximal rénal, où il est responsable de la réabsorption d'environ 10 % du glucose filtré. En plus de l'intestin et du rein, l'ARNm de hSGLT1 a été détecté dans le cœur, les testicules, la prostate, le côlon, la trachée, le poumon, le cerveau, la moelle épinière, la rate, le foie, l'utérus, le pancréas et les vaisseaux sanguins (Chen *et al.*, 2010; Poppe *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2003).

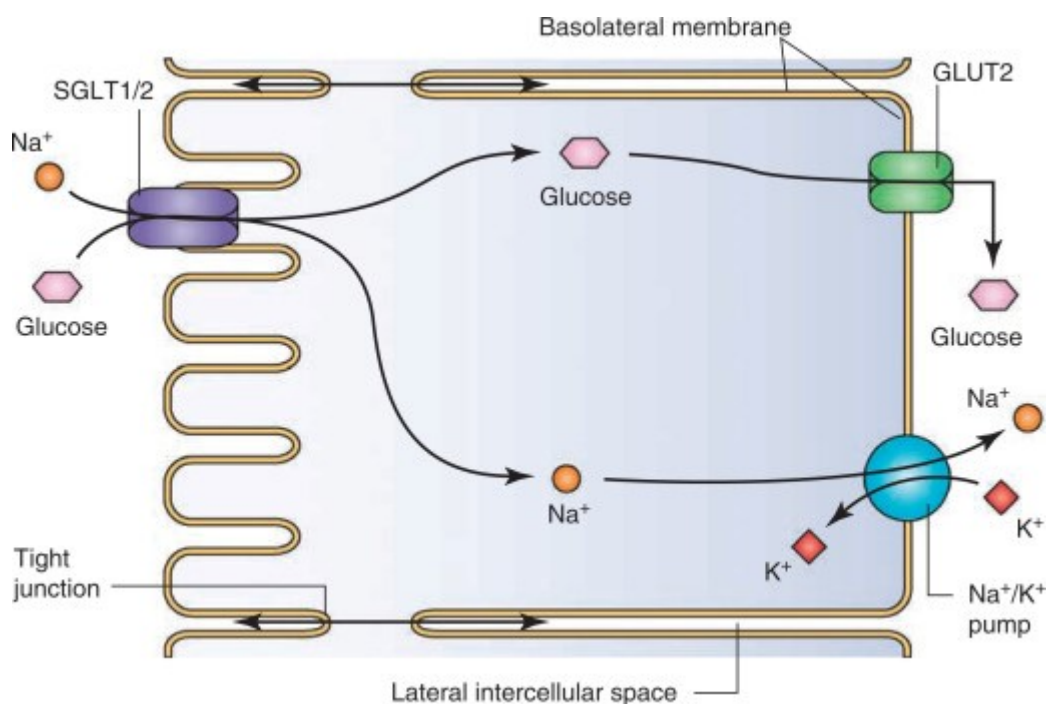
Dans les cellules épithéliales de l'intestin, le SGLT1 transporte le glucose de la lumière intestinale contre son gradient de concentration, puis ce dernier franchit passivement la membrane basolatérale vers le sang grâce au GLUT2 (Uldry et Thorens, 2004). Les souris knockout GLUT 2 présentent une cinétique de transport intestinal de glucose normale (Stumpel *et al.*, 2001) suggérant la présence d'autres transporteurs facilitateurs de la membrane basolatérale (Wright *et al.*, 2004). En revanche, le transport intestinal de glucose lié au SGLT1 semble être central. Chez l'homme, les mutations du gène de SGLT1 sont responsables d'une maladie génétique rare : la malabsorption intestinale de glucose-galactose (GGM) (Wright, 1998; Wright *et al.*, 2002) qui est traitée en remplaçant le glucose et le galactose alimentaire par le fructose (Turk *et al.*, 1991; Carbonnel *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 1997). Ce désordre autosomique récessif entraîne une diarrhée osmotique sévère causée par l'excès de glucose et de galactose non absorbé dans la lumière intestinale, conduisant à la déshydratation, l'acidose métabolique et la mort. Des symptômes identiques sont retrouvés chez les souris invalidées pour le gène du SGLT1 (Gorboulev *et al.*, 2012) avec cependant peu ou pas de glucosurie (Santer. *Et al.*, 2010). De façon quelque peu inattendue, l'inhibition pharmacologique de SGLT1 ne semble pas induire de diarrhée grave chez l'homme (Zambrowicz *et al.*, 2012).

### VII-2.2 Le SGLT2

C'est une protéine codée par le gène *SLC5A2* et est exprimée dans la membrane apicale des cellules épithéliales de la bordure en brosse des segments S1 et S2 du tubule rénal proximal, il assure le transport du glucose couplé au sodium avec une stœchiométrie de  $1 \text{ Na}^+ / 1$  glucose (Kanai *et al.*, 1994; Hummel *et al.*, 2011) et est responsable de la réabsorption de 90 % du glucose filtré au niveau rénal. En plus des reins, l'ARNm hSGLT2 a été détecté dans les

testicules, les artères cérébrales et le cervelet et le pancréas (Chen *et al.*, 2010 ; Wright *et al.*, 2011 ; Zhou *et al.*, 2003, Bonner *et al.*, 2015). Nous n'avons pas détecté l'ARNm de hSGLT2 dans l'intestin grêle, le foie, le cœur, les poumons, les tissus adipeux et le cerveau par RT-PCR. Le SGLT2 a une faible affinité ( $K_m = 6 \text{ mM}$ ) mais une très haute capacité de transport du glucose. Le SGLT2 transporte le glucose à partir du filtrat glomérulaire dans les cellules épithéliales du tubule et le GLUT2 facilite la sortie du glucose à travers la membrane basolatérale vers le liquide interstitiel d'où il sera capté par les capillaires péri-tubulaires afin de rejoindre la circulation sanguine (Abdul-Ghani *et al.*, 2011). GLUT2 est crucial pour le transport de glucose basolatéral dans le rein, contrairement à celui de l'intestin grêle. Ainsi, des mutations de GLUT2 entraînent une glycosurie pouvant atteindre 200 g par jour (Wright *et al.*, 2011).

Des mutations dans la séquence du SGLT2 sont responsables de glycosuries rénales familiales (FRG) (Santer *et al.*, 2003; Calado *et al.*, 2008). Ce défaut génétique bénin provoque une glycosurie persistante, avec une excrétion de glucose jusqu'à 160 g/jour, sans hypoglycémie.



**Figure 16 : Le transport du glucose via les SGLTs (Bakris *et al.*, 2009)**

### VII-2.3 Modulation de l'expression de SGLT1 et SGLT2 en conditions pathologiques

Il a été décrit qu'en conditions pathologiques telles que l'ischémie cardiaque, l'insuffisance cardiaque et l'hyperglycémie chronique, les besoins en glucose des cardiomyocytes sont accrus (Tian *et al.*, 2001). Dans un contexte de diabète, d'autres cellules accroissent le transport du glucose tel que les cellules musculaires squelettiques, les cellules épithéliales rénales, les hépatocytes et les adipocytes (Bogan *et al.*, 2012). Ce transport accru est assuré par la surexpression de divers transporteurs dont les GLUTs et les SGLT1 et SGLT2 (Balteau *et al.*, 2011 ; Banerjee *et al.*, 2009 ; Bogan *et al.*, 2012). Des évidences indiquent qu'une forte concentration extracellulaire de glucose augmente à la fois l'expression génique et l'activité du SGLT1, aussi bien dans les vésicules membranaires préparées à partir de segment d'intestin, et dans les cellules épithéliales du tubule proximal rénal (LLC-PK1). Ainsi, le glucose est le principal modulateur de l'expression génique du SGLT1 dans l'intestin et le rein (Lescale-Matys *et al.*, 1993 ; Vayro *et al.*, 2001). En revanche, dans les CEs d'artères cérébrales de porc, il a été rapporté que l'activité du SGLT1 était augmentée après incubation des cellules avec une faible concentration de glucose, sans aucun changement dans son expression (Nishizaki et Matsuoka, 1998). En effet, L'absorption du glucose marqué, dans les CEs du cerveau a été inhibée par plus de 95% par les inhibiteurs des GLUTs (phlorétine et le cytochalacine B) dans les cellules en normo glucose, indiquant le rôle majoritaire des GLUTs. Après un prétraitement des CEs avec des milieux sans glucose, l'absorption du glucose marqué a été augmentée et cette augmentation a été inhibée par l'inhibiteur de SGLT1, et par la privation de Na<sup>+</sup>. Ces résultats montrent une relation inverse entre la concentration de glucose extracellulaire et l'activité de SGLT1 suggérant un rôle de SGLT1 dans le maintien d'une concentration adéquate de glucose en conditions d'hypoglycémie dans les cellules endothéliales du cerveau.

De manière intéressante, plusieurs équipes ont observé des changements dans l'expression du SGLT1 dans les états pathologiques. Comparativement aux souris de type sauvage, une augmentation de l'expression du SGLT1 dans le cœur a été observé chez les souris *ob/ob* obèses, un modèle de diabète de type 2 qui présente un métabolisme du glucose myocardique altéré. À l'inverse, l'expression du SGLT1 dans le cœur est significativement diminuée chez les souris traitées par streptozotocine, un modèle de diabète de type 1. (Banerjee *et al.*, 2009). Ces observations ont été confirmées dans le tissu cardiaque humain, où l'expression du SGLT1 est augmentée chez les sujets atteints de cardiomyopathie diabétique et ischémique. Cependant,



aucun changement de l'expression de SGLT1 n'a été observé dans la cardiomyopathie idiopathique (Banerjee *et al.*, 2009). Il a été postulé que l'expression accrue du SGLT1 dans le cœur diabétique pourrait être un changement adaptatif en réponse à une réduction de l'expression cardiaque de GLUT1 et GLUT4. Par ailleurs, l'expression myocardique du SGLT1 semble augmenter avec l'âge avec un niveau d'ARNm SGLT1 progressivement augmenté entre 2 à 20 semaines chez la souris (Banerjee *et al.*, 2009).

De façon intéressante, le SGLT1 des capillaires des muscles squelettiques serait nécessaire pour l'action de l'insuline sur l'entrée de glucose dans les myocytes (Elfeber *et al.*, 2004). Ceci est peut-être expliqué par le fait que l'insuline en activant la PKC, elle phosphoryle le SGLT1, induisant sa translocation à la membrane plasmique et l'augmentation de l'entrée du glucose dans la cellule.

Une autre étude a également montré que l'activation de la NADPH oxydase par le « high glucose » dans des cardiomyocytes, nécessite la présence du SGLT1 (Balteau *et al.*, 2011), alors que les métabolites du glucose (*O*-linked N-acétylglucosamine, glucose 6-phosphate) ne jouent aucun rôle dans l'activation de la NADPH oxydase, suggérant un rôle de SGLT1 dans l'activation de la NADPH oxydase et la production de ROS en réponse au high glucose, indépendamment du métabolisme du glucose. Ceci est confirmé par la capacité d'un glucose non métabolisable à activer la NADPH oxydase et produire des ROS (Balteau *et al.*, 2011),

L'expression des transporteurs SGLT2 est également modulée en conditions pathologiques. L'exposition des cellules épithéliales rénales au HG augmente l'expression génique et protéique de SGLT1 et SGLT2 et est associée à une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- $\alpha$ ). En retour, ces cytokines ajoutées au milieu induisent l'expression génique et protéique de SGLT2 mais pas de SGLT1, indiquant une modulation autocrine de l'expression de SGLT2 par les cytokines (Maldonado-Cervantes *et al.*, 2012). Ces résultats suggèrent une activation de SGLT2 probable au cours du diabète qui est associé à une sécrétion accrue de cytokines. Chez les patients diabétiques les concentrations plasmatiques et urinaires d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  sont élevées, et leurs taux corrélés avec la progression de la néphropathie diabétique (Navarro-Gonzalez *et al.*, 2008).

L'expression du SGLT2 est également augmentée dans les cellules épithéliales du tubule rénal de rats hypertendus (Bautista *et al.*, 2003) et dans le rein des animaux diabétiques DT2 (Freitas *et al.*, 2008; Vallon *et al.*, 2011). L'expression de SGLT2 dans les cellules tubulaires récoltées à partir des urines de sujets diabétiques sont augmentées par rapport à celles provenant de sujets

non diabétiques (Rahmoune *et al.*, 2005). Nakamura *et al.*, ont essayé de déterminer les facteurs associés au diabète pouvant être impliqués dans la surexpression du SGLT2 dans le rein diabétique. Ils ont montré que l'insuline et le peroxyde d'hydrogène induisent une surexpression des SGLT2 dans les cellules épithéliales rénales en culture. La surexpression des SGLT2 induite par l'insuline était associée à une augmentation de l'entrée du glucose et une génération de ROS. Tous ces effets étaient prévenus par un prétraitement avec l'antioxydant NAC, suggérant un rôle clé du stress oxydant dans la régulation de l'expression des SGLT2. (Nakamura *et al.*, 2015).

Symétriquement, le traitement des rats diabétiques par l'Empagliflozine qui présente une forte sélectivité pour le SGLT-2, diminue le stress oxydant, la réaction inflammatoire et fibrotique dans le rein et dans l'aorte, et est associée à l'expression réduite de MCP-1, ICAM-1, PAI-1 et du TGF- $\beta$ , et ce, en partie via une limitation de la voie signalisation AGEs-RAGE (Ojima *et al.*, 2015). *In vitro*, une précédente étude avait montré que l'antioxydant NAC ou l'inhibition de SGLT-2 par mRNA interférence inhibaient les effets délétères du « high glucose » dans les cellules épithéliales du tube proximal rénal (Maeda *et al.*, 2013), confirmant le rôle du stress oxydant dans la réponse SGLT-2 dépendante. Dans les cellules épithéliales tubulaires humaines HK2, l'Empagliflozine prévient l'entrée du glucose et réduit l'expression de l'interleukine-6 et du collagène de type 4 induite par le « high glucose » en supprimant l'activation rédox-sensible de NF-KB (Panchapakesan *et al.*, 2013).

Partant du fait que les cellules tubulaires rénales de patients atteints de néphropathie diabétique présentent un phénotype sénescence (Verzola *et al.*, 2008) et que la surexpression de p21 dans les cellules tubulaires proximales provoque des lésions rénales (fibrose, inflammation, apoptose) qui pourraient être impliqués dans la pathophysiologie de la néphropathie diabétique (Fan *et al.*, 2011; Kitada *Et al.*, 2012), Kitada et ses collègues ont montré que l'hyperglycémie pouvait provoquer la sénescence des cellules épithéliales tubulaire rénales par un mécanisme dépendant du SGLT2 dans un modèle de diabète de type 1 induite par streptozotocine chez la souris. En effet, par comparaison aux souris saines, la coloration SA- $\beta$ -Gal ainsi que l'expression rénale de p21 étaient augmentées chez les souris diabétiques. *In vitro*, l'exposition de cellules tubulaires proximales humaines à des concentrations élevées de glucose augmentait aussi l'expression des marqueurs de la sénescence, alors que l'expression de p21, ou le nombre de cellules porteuses de SA- $\beta$ -Gal était réduit en présence d'un siRNA SGLT2, suggérant un rôle de SGLT2 dans la sénescence rénale induite par le high glucose (Kitada *et al.*, 2014). Ces

données indiquant un rôle prépondérant de SGLT-2 dans la sénescence épithéliale rénale sont en accord avec l'expression de p21 augmentée dans les tubules proximaux corticaux du rein diabétique, dont la majorité sont des segments S1 et S2 riches en SGLT2, alors que les tubules proximaux médullaires externes, riches en SGLT1, ne présentent pas d'expression détectable de p21 (Santer & Calado *et al.*, 2010).

## **VIII- Les inhibiteurs des SGLT2**

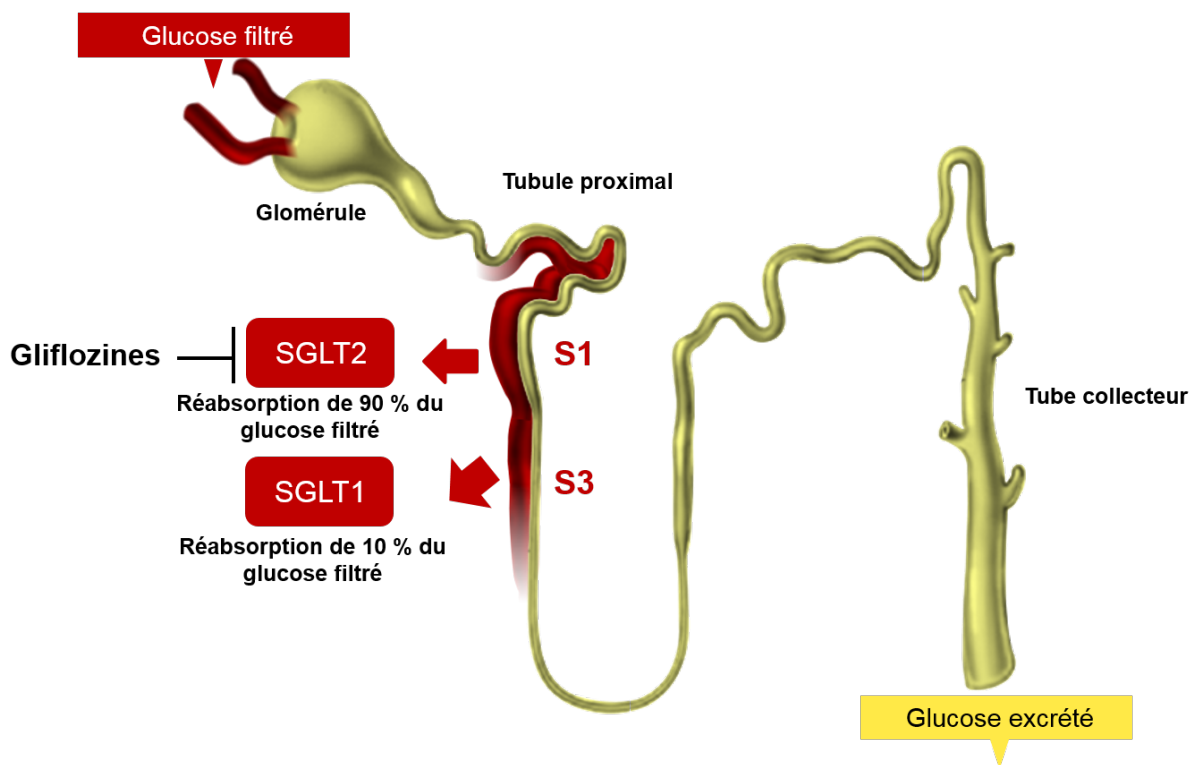
### ***VIII-1 Découverte des inhibiteurs des SGLT2***

La structure des gliflozines est dérivée de celle d'une substance naturelle, la phlorizine - un  $\beta$ -glucopyranoside - découverte en 1835 dans l'écorce de racine d'un pommier (*Malus sp. Rosaceae*). La phlorizine est un puissant inhibiteur compétitif et non sélectif de SGLT1 et SGLT2, sans effet sur le transport dépendant des GLUT (Brazy et Dennis, 1978; Bell *et al.*, 1990 ; Petersen *et al.*, 1991). La phlorizine est rapidement dégradée par les  $\beta$ -glucosidases dans le tractus gastro-intestinal, expliquant sa faible biodisponibilité (Crespy *et al.*, 2001). L'administration parentérale de la phlorizine chez les rats diabétiques et l'homme, entraîne une glycosurie et une normalisation de la glycémie (Rossetti *et al.*, 1987 ; Kahn *et al.*, 1991; Zhao *et al.*, 2004 ; Masumoto *et al.*, 2009). Freitas *et al.*, ont comparé l'efficacité de la phlorizine au traitement par l'insuline. Bien que les deux traitements réduisent considérablement la glycémie chez les rats diabétiques, la phlorizine n'a eu aucun effet sur le poids corporel ou les taux d'insuline plasmatique alors qu'ils étaient augmentés par le traitement insulinique (Freitas *et al.*, 2008). La connaissance de la structure et du mécanisme d'action de la phlorizine est à l'origine de la synthèse d'analogues structuraux constituant une nouvelle classe d'antidiabétiques ciblant le SGLT2 avec pour objectif d'inhiber la réabsorption du glucose dans le rein, sans affecter le transport intestinal médié par le SGLT1.

### ***VIII-2 Mécanisme d'action des inhibiteurs de SGLT2***

La charge du glucose filtrée dans un rein normal est d'environ 180 g/jour. Au fur et à mesure que le filtrat glomérulaire traverse le tubule proximal, la concentration de l'ultra filtrat en glucose diminue considérablement grâce à la réabsorption tubulaire qui est assurée à 90% par les SGLT2 présents dans les segments S1 et S2 du tubule proximal rénal, les 10 % restants sont réabsorbés par le SGLT1 au niveau du segment distal S3. À la sortie, seulement 500 mg de

glucose sont excrétés dans l'urine, ce qui représente environ 1% du glucose filtré. Quand la charge du glucose filtrée est inférieure à 375 mg/min comme c'est le cas chez les sujets non diabétiques, tout le glucose filtré est réabsorbé pour retourner dans la circulation. En revanche, si la charge de glucose filtrée dépasse 375 mg/min, comme c'est le cas chez les diabétiques, la capacité maximale du transport du glucose ( $T_m$ ) est dépassée et tout le glucose excédant le  $T_m$ , est excrété dans l'urine. De ce fait, l'inhibition du SGLT2 entraîne une forte augmentation de l'excrétion urinaire de glucose ( $\approx 80$  g/jour), ce qui représente une perte calorique de l'ordre de 300 kcal. Ce mode d'action permet une réduction notable, à la fois de l'hyperglycémie à jeun et de l'hyperglycémie postprandiale. Le mode d'action des inhibiteurs de SGLT2 est indépendant de l'insuline, de ce fait le risque d'hypoglycémie est moindre et leur efficacité est préservée indépendamment de la détérioration des cellules  $\beta$  pancréatiques. Ces molécules peuvent donc être prescrites quel que soit le stade de la maladie.



**Figure 17 : Mécanisme d'action des inhibiteurs de SGLT2**

De manière intéressante, les transporteurs SGLT2 sont surexprimés par les cellules épithéliales du tube proximal chez les patients diabétiques (Rahmoune *et al.*, 2005), vraisemblablement suite à une réponse adaptative à l'augmentation de la filtration glomérulaire du glucose retrouvée également chez les rongeurs diabétiques. Dans différents modèles génétiques de diabète, une augmentation de l'expression de SGLT2 au niveau rénal est retrouvée (Vallon *et*

*al.*, 2012 ; Vallon *et al.*, 2015). Cette observation est en accord avec l'augmentation de la capacité de la réabsorption du glucose dans le tubule proximal observée chez les rats diabétiques (Dominguez *et al.*, Noonan *et al.*). Ainsi, la surexpression des SGLT2 dans le diabète, contribue à la capacité accrue de réabsorption du glucose rénal. Les inhibiteurs de SGLT2 diminuent donc la capacité maximale de réabsorption du glucose par le tubule proximal rénal, dans le contexte du diabète.

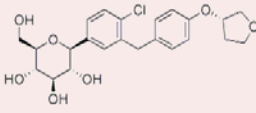
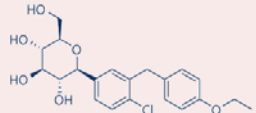
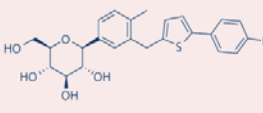
Quant à l'expression de SGLT1 dans le diabète, les observations divergent. Les études ont fourni des preuves d'une expression et/ou d'une activité de SGLT1 augmentée, inchangée ou réduite dans des modèles animaux de diabète, ou *in vitro* en conditions de glucose élevé (Vallon *et al.*, 2012). Néanmoins, il a été démontré que le transport du glucose médié par SGLT1 augmente fortement chez la souris non diabétique, après inhibition génétique ou pharmacologique de SGLT2 (Rieg *et al.*, 2014). Une compensation par SGLT1 en réponse à l'inhibition de SGLT2, semble probable et est compatible avec l'augmentation (67 %) de l'excrétion urinaire du glucose chez les souris double knock-out de SGLT1 et SGLT2, comparé aux souris knock-out SGLT2 (Powell *et al.*, 2013) et avec le fait que les inhibiteurs de SGLT2 n'entraînent qu'une réduction de 30–50% de la réabsorption du glucose chez l'homme (Heise *et al.*, 2013 ; Komoroski *et al.*, 2009 ; Sha *et al.*, 2011).

Cependant, cette augmentation compensatoire du transport médié par SGLT1 en réponse à l'inhibition de SGLT2 pourrait être réduite chez la souris diabétique traitée par Empagliflozine. L'administration d'Empagliflozine à la souris diabétique Akitas a diminué l'expression du SGLT1 dans le rein (Vallon *et al.*, 2014). Ceci pourrait limiter la réabsorption du glucose dans le segment S3 du tubule proximal (riche en SGLT1) et favoriser l'effet glycosurique de l'Empagliflozine (Powell *et al.*, 2013).

### ***VIII-3 L'Empagliflozine, un inhibiteur sélectif de SGLT2***

Le SGLT1 étant exprimé dans l'intestin et dans le cœur, son inhibition peut entraîner des troubles gastro-intestinaux (diarrhée et déshydratation) et impacter le transport du glucose dans le cœur. Il a été montré que les effets inotropes positifs exercés par l'insuline dans des cultures de cardiomyocytes primaires, a été réduit après l'inhibition des transporteurs SGLT1 (Von Lewinski *et al.*, 2010).

Bien que les différents inhibiteurs du SGLT2 aient une structure relativement semblable, leur sélectivité diffère. L'Empagliflozine présente la plus haute sélectivité pour le SGLT-2 par rapport au SGLT-1 (CI<sub>50</sub> de 3,1 nM pour hSGLT-2 versus 8300 nM pour hSGLT1) (Grempler *et al.*, 2012, cf. Tableau).

Molécule	Empagliflozine	Dapagliflozine	Canagliflozine
Spécialité	JARDIANCE®	FORXIGA®	INVOKANA®
Structure chimique			
Doses thérapeutiques (mg/jour)	10 - 25	5 - 10	100 - 300
Sélectivité (SGLT2 versus SGLT1)	1 : 2500	1 : 1200	1 : 414

**Figure 18 : Tableau représentatifs des différents inhibiteurs de SGLT2**

### VIII-3. 1 Etude de l'efficacité clinique de l'Empagliflozine

L'efficacité de l'Empagliflozine à réduire la glycémie a été étudiée en monothérapie et en association avec d'autres antidiabétiques (Metformine, sulfonylurée, pioglitazone, linagliptine et insuline). Une méta analyse incluant 10 études cliniques avec 6203 patients atteints de DT2 mal contrôlé, a montré que le traitement avec Empagliflozine 10 mg ou 25 mg par jour a permis une réduction significative de l'HbA1c par rapport au placebo avec des valeurs moyennes de -0,62% (CI à 95%, -0,68 à -0,57%) pour la dose 10 mg/j et de -0,66% (CI à 95%, -0,76 à -0,57%) pour la dose 25 mg/j. La dose 25 mg/j avait une efficacité glycémique similaire à la Metformine ou à la sitagliptine (WMD -0,11%, 95% CI -0,25 à 0,03%), sans augmenter le risque d'hypoglycémie. Le traitement a été associé une perte de poids corporel (de -2.5 kg pour l'Empagliflozine 10 mg/j et de - 3.2 kg pour l'Empagliflozine 25 mg/j), et une réduction significative de la pression artérielle systolique (de -2,6 mmHg pour l'Empagliflozine 10 mg/j p=0.0231 et de -3,4 mmHg pour l'Empagliflozine 25 mg/j, p=0,0028). L'incidence de l'hypoglycémie était similaire à celle du placebo (OR 1,10; IC 95%: 0,87 à 1,39), cependant un risque accru d'infections des voies génitales a été observé (OR 3,31; IC 95%: 1,55 à 7,09) (Liakos *et al.*, 2014).

*En conclusion, l'Empagliflozine réduit efficacement la glycémie et offre des avantages cliniques supplémentaires tels que la perte de poids corporel et la réduction de la pression artérielle.*

### *VIII-3.2 Etude de la sécurité cardiovasculaire de l'Empagliflozine : EMPA-REG OUTCOME*

Suite aux nouvelles directives concernant la démonstration de la sécurité cardiovasculaire des antidiabétiques, émises par la FDA en 2008, une étude clinique **EMPA-REG OUTCOME** a été entreprise afin de démontrer l'innocuité d'un traitement par Empagliflozine sur le risque cardiovasculaire chez les patients atteints de diabète de type 2.

Il s'agit d'un essai clinique prospectif, randomisé, en double aveugle, contrôlé versus placebo, dont l'objectif principal était d'étudier les effets à long terme de l'Empagliflozine versus placebo en plus de la prise en charge standard, sur la morbi-mortalité cardiovasculaire chez des patients diabétiques de type 2 à haut risque cardiovasculaire.

7 020 patients ont été randomisés en 3 bras : 2 333 dans le bras placebo, 2 345 dans le bras Empagliflozine 10 mg, 2 342 patients dans le bras Empagliflozine 25 mg, pour une **durée** médiane de traitement de 2,6 ans et une durée de suivi de 3,1 ans.

Les critères d'inclusion de l'étude étaient les suivants :

- Adultes diabétiques de type 2.
- IMC inférieur ou égal à 45 kg/m<sup>2</sup>.
- HbA1c comprise entre 7 et 10 %.
- Maladie CV établie (antécédents d'IDM, AVC, coronaropathie, angor instable, artériopathie oblitérante des membres inférieurs).

**Le critère primaire** d'évaluation était un critère composite associant le temps de survenue d'une mortalité cardiovasculaire, d'un IDM non fatal ou d'un AVC non fatal. **Le critère secondaire** d'évaluation comprenait l'hospitalisation pour angor instable, l'hospitalisation pour insuffisance cardiaque et la mortalité toutes causes.

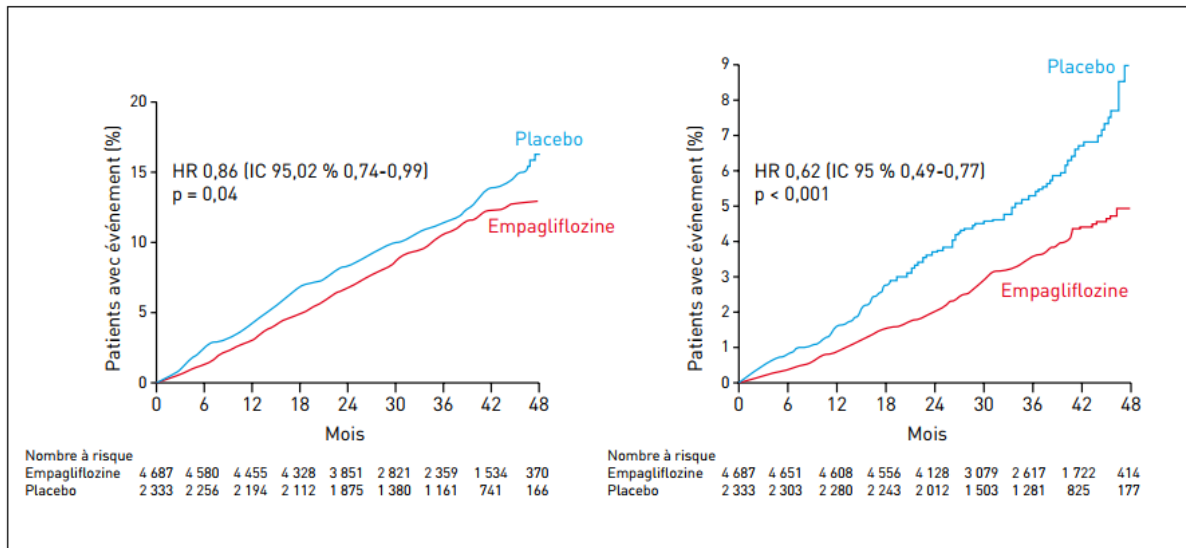
Les Résultats de l'étude EMPA-REG OUTCOME, publiée en 2015 est la première à démontrer une supériorité par rapport au placebo, sur les critères de jugement cardiovasculaires.

Les investigateurs ont observé :

- Une réduction de 14 % du critère d'évaluation primaire était retrouvée avec l'Empagliflozine (HR 0,86 ; IC 95 % 0,74-0,99 ; P=0,04), essentiellement liée à une

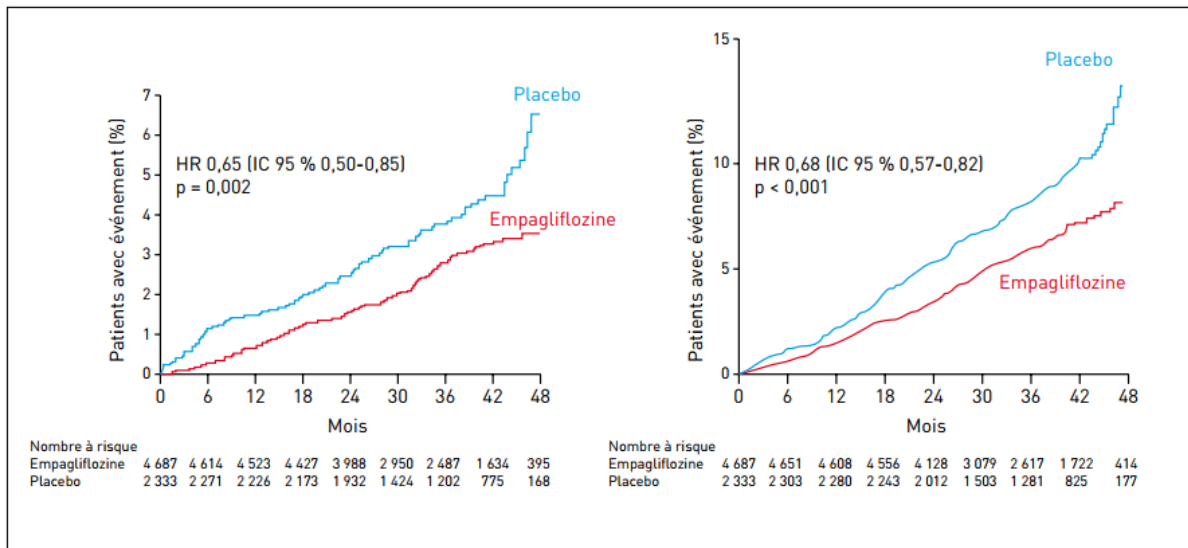
baisse de 38 % de la mortalité cardiovasculaire (HR 0,62; IC 95 % 0,49-0,77; P<0,001), avec absence de bénéfice sur les IDM et les AVC.

- Une réduction de 35 % des hospitalisations pour insuffisance cardiaque était notée avec l'Empagliflozine (HR 0,65 ; IC 95 % 0,50-0,85 ; P=0,002).
- Une réduction de 32 % de la mortalité toutes causes (HR 0,68 ; IC 95 % 0,57-0,82 ; P<0,001).



**Figure 19 : Résultats de l'étude EMPA-REG concernant le critère primaire (à gauche) et la mortalité CV (à droite)**





**Figure 20 : Résultats de l'étude EMPA-REG concernant les hospitalisations pour IC (à gauche) et la mortalité toutes causes (à droite)**

## IX- Mécanismes potentiels de la baisse de mortalité CV avec l'Empagliflozine

Plusieurs hypothèses ont été émises pour identifier les causes et mécanismes sous-jacents aux bénéfices cardiovasculaires observés par traitement par l'Empagliflozine. Ces derniers semblent être multifactoriels.

### IX-1 Modulation des facteurs de risque CV

Le traitement par Empagliflozine a entraîné une baisse de la glycémie (-0,6% d'HbA1c) accompagnée d'une réduction de la pression artérielle (> 5 mmHg) et une perte de poids (3-5 kg) qui sont une conséquence directe de l'action sur le SGLT2 : L'inhibition du SGLT2 favorise d'une part, la glycosurie, ce qui conduit à une perte calorique se traduisant par une perte de poids, dans une population souvent en surpoids (Vasilakou *et al.*, 2013). D'autre part, l'excrétion de Na<sup>+</sup> promeut la diurèse et la réduction de la PAS (Heerspink *et al.*, 2016). Par ailleurs, l'Empagliflozine a également montré des effets favorables sur les marqueurs de la rigidité artérielle et de la résistance vasculaire (Mellbin *et al.*, 2012). Les données provenant d'un essai de 8 semaines ont démontré que l'Empagliflozine réduisait la rigidité artérielle chez les patients atteints de diabète de type 1 (Chilton *et al.*, 2014). Cependant, ces bénéfices restent malgré tout relativement modérés, et ne peuvent expliquer les résultats spectaculaires de

l'étude. De plus, il est important de noter que dans le cadre de l'EMPA REG, les bénéfices CV ont été observés dans une population présentant une maladie cardiovasculaire établie, chez laquelle les différents facteurs de risque cardiovasculaire tels que la pression artérielle et la dyslipidémie, sont déjà bien pris en charge (statines, 77%, inhibiteurs du système rénine-angiotensine-aldostérone, 81%,  $\beta$ -bloquants, 60% et antiagrégants plaquettaires, 90%). La réduction du risque de mortalité cardiovasculaire dans le groupe Empagliflozine était cohérente entre les sous-groupes et la réduction de la PA semble être de la même ampleur indépendamment du traitement de fond. (Baker *et al.*, 2014), suggérant un bénéfice indépendant des facteurs de risque CV.

De plus, rappelons que dans l'étude UKPDS observationnelle, une diminution de 10 mm Hg de la PAS était associée à une baisse de seulement 15% de mortalité chez les diabétiques de type 2 (Adler *et al.*, 2000). L'absence d'effet bénéfique sur les AVC suggère que la réduction de 5 mmHg a des effets cliniques limités. La réduction des hospitalisations pour insuffisance cardiaque, fait mettre en avant l'effet de la diurèse osmotique lié au mécanisme d'action des inhibiteurs des SGLT2. Cependant, aucun diurétique n'a entraîné une réduction aussi importante de la mortalité CV. Dans les méta-analyses (Psaty *et al.*, 2003 ; Olde Engberink *et al.*, 2015), les agents diurétiques semblent être associés à une réduction plus faible de la mortalité CV (~20%) et à une réduction du risque d'AVC, ce qui n'était pas observé dans l'essai EMPA-REG.

### *IX-2 Effet de l'empagliflozine sur l'athérosclérose*

Les effets majeurs de l'étude EMPA-REG sur le risque CV ont été observés dès le début de l'étude (dès 3 mois de traitement), ce qui n'est pas en faveur d'une réduction des mécanismes athérotrombotiques. Ceci est également confirmé par l'absence d'effet de l'Empagliflozine sur les IDM non fatals. Pourtant dans des modèles de souris diabétiques l'abaissement de la glycémie par les inhibiteurs de SGLT-2 réduit le nombre de monocytes et de neutrophiles circulants et s'accompagne d'une régression des lésions athérosclérotiques (Nagareddy *et al.*, 2013) et d'une diminution des concentrations plasmatiques des marqueurs de l'inflammation (IL-6, TNF $\alpha$ , MCP-1 et la protéine c-réactive) et du stress oxydant (thiobarbituric acid reactive substances and protein carbonyl) (Tahara *et al.*, 2013 ; Osorio *et al.*, 2012) qui sont des processus impliqués dans la physiopathologie de l'athérosclérose. En effet, la migration des leucocytes inflammatoires dans les lésions athérosclérotiques entraîne une progression de la

maladie. Les mécanismes impliqués dans bénéfice CV précoce de l'Empagliflozine chez les patients à haut risque CV reste donc à décrypter.

### *IX-3 Protection de la fonction rénale par l'empagliflozine*

Les atteintes rénales du diabétique constituent un facteur de risque majeur pour les maladies CV. Dans EMP-AREG OUTCOME, l'inhibition du SGLT2 est associée à une réduction aiguë du taux de filtration glomérulaire estimée à 5 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> et 30% à 40% de réduction de l'albuminurie (Vallon *et al.*, 2014). D'un point de vue vasculaire, les changements rénaux hémodynamiques associés au diabète seraient impliqués. En effet, au début du diabète, l'hyperglycémie provoque une augmentation de la réabsorption tubulaire proximale en raison d'une régulation positive de l'expression de SGLT-2 (Mogensen *et al.*, 1971 ; Rahmoune *et al.*, 2005), conduisant à une diminution de la charge de soluté en Na<sup>+</sup> à la macula densa, à l'altération du rétrocontrôle tubulo-glomérulaire et à une augmentation de la filtration glomérulaire (Vallon *et al.*, 1999 ; Thomson *et al.*, 2001). Dans un modèle de DT1, il a été observé que l'hyperfiltration rénale était réduite par l'inhibition de SGLT-2 (Herney *et al.*, 2014), en raison d'une augmentation de la résistance artériolaire afférente, sans altération de la résistance artériolaire efférente (Škrtić *et al.*, 2014), conduisant ainsi à une atténuation de l'hypertension intra-glomérulaire, caractéristique de la néphropathie diabétique précoce (Gilbert *et al.*, 2014).

L'ensemble de ces données suggère un mécanisme de protection rénale dans lequel l'inhibition de SGLT-2 augmente la distribution distale du sodium tubulaire, ce qui altère le rétrocontrôle tubulo-glomérulaire et atténue l'hypertension intra-glomérulaire. Ces effets confirment les observations précliniques suggérant que la natriurèse au niveau du tubule proximal active un rétrocontrôle tubulo-glomérulaire rénal grâce à la libération accrue de sodium à la macula densa, entraînant une vasoconstriction afférente. Ceci pourrait expliquer en partie pourquoi une légère réduction du taux de filtration glomérulaire est observée lorsque le traitement avec les inhibiteurs de SGLT-2 est initié, indépendamment des effets sur la glycémie (Cherney *et al.*, 2014).

Enfin, la publication de l'étude EMPA-REG RENAL en 2016 confirme un effet bénéfique sur la fonction rénale : l'Empagliflozine est associée à une progression plus lente de la maladie rénale du diabétique et à une réduction du nombre d'événements rénaux tels que l'apparition ou

l'aggravation des néphropathies, greffes de rein et mortalité due à une maladie rénale (EMPA-REG RENAL, 2016).

#### *IX-4 Faible risque hypoglycémique*

Du fait de leur mode d'action indépendant de la sécrétion d'insuline, les inhibiteurs de SGLT-2 ont un faible risque d'hypoglycémie, ce qui a été associé à une augmentation des événements CV dans l'étude ADVANCE. De plus, les inhibiteurs de SGLT2 réduisent la variabilité des taux de glucose. Ils préviennent l'hypoglycémie à jeun en entraînant une augmentation compensatoire de la libération de glucose endogène, et une diminution de l'absorption de glucose tissulaire, équilibrant ainsi le glucose perdu dans l'urine. Sans cette compensation, la même glycosurie aurait causé une glycémie à jeun de 4,7 mmol/l au lieu des 6,7 mmol/l observés (Ferrannini *et al.*, 2014). Les inhibiteurs de SGLT2 ont également un potentiel de corriger les taux de glucose post-prandial (Komoroski *et al.*, 2009 ; Heise *et al.*, 2013). Ces réductions de la variabilité du glucose pourraient avoir des effets CV bénéfiques. L'hyperglycémie post-prandiale et la variabilité du glucose ont été liées à une augmentation du risque de CV (Standl *et al.*, 2011).

#### *IX-5 Amélioration de la sensibilité à l'insuline*

De récentes études ont également suggéré que l'augmentation de la glycosurie induite par les inhibiteurs de SGLT-2 améliore la sensibilité à l'insuline mesurée par l'absorption de glucose périphérique (Ferrannini *et al.* 2014 ; Merovci *et al.*, 2014). Cette sensibilité améliorée contribuerait indirectement à l'amélioration du risque CV sous traitement par Empagliflozine puisque que la résistance à l'insuline et l'hyperinsulinémie ont été associés à un risque accru d'athéro-thrombose (Howard *et al.*, 1996).

#### *IX-6 Utilisation des corps cétoniques comme substrats énergétiques : l'hypothèse du "substrat économe"*

La glycosurie induite par l'Empagliflozine réduit la glycémie à jeun et postprandiale. Suite à cette perte de glucose, le métabolisme subit des changements adaptatifs impliquant les flux de glucose, les réponses hormonales, ainsi que les dépenses énergétiques. Ainsi, l'inhibition des SGLT2 abaisse les concentrations d'insuline et augmente les concentrations de glucagon, avec

une augmentation concomitante de la mobilisation des lipides et de leur utilisation comme source d'énergie (Ferrannini *et al.*, 2014). En effet, à long terme, le déficit d'oxydation du glucose est compensé par une oxydation supplémentaire des lipides, pour maintenir l'équilibre énergétique. Cette lipolyse entraîne une augmentation des taux de corps cétoniques circulants. Le  $\beta$ -hydroxybutyrate est le corps cétonique le plus abondant.

Il a été montré que, pendant les périodes de jeûne, le  $\beta$ -hydroxybutyrate sert de carburant, en remplaçant partiellement le glucose. En effet, le  $\beta$ -hydroxybutyrate contribue à 15% des dépenses énergétiques du cœur au repos, comparé à une contribution de 45% pour le glucose, lactate et pyruvate. Cependant, au cours de l'exercice, la contribution du  $\beta$ -hydroxybutyrate est élevée à ~ 40%, continuant ainsi à soutenir le travail cardiaque.

Pendant les périodes interprandiales, l'insuline inhibe la lipolyse et stimule l'oxydation du glucose. De ce fait, l'absorption du  $\beta$ -hydroxybutyrate et sa contribution aux dépenses énergétiques cardiaques sont presque nulles. Cependant, puisque chez les diabétiques, la captation du glucose médiée par l'insuline est altérée, environ 70% de l'énergie provient de l'oxydation des substrats gras. De manière intéressante, lorsque le  $\beta$ -hydroxybutyrate est ajouté au milieu de perfusion des cœurs de rat, la chaleur de combustion par unité de carbone est augmentée de 31% et la consommation d'oxygène diminué de 27%, améliorant ainsi l'efficacité cardiaque de 24% (Sato *et al.*, 1995).

Ce déplacement de substrat, des acides gras libres vers les corps cétoniques, substrats énergétiquement plus économes, présente d'autres avantages, notamment la diminution du stress oxydant. En effet, des études *in vitro* (cellules épithéliales rénales humaines) et *in vivo*, ont montré qu'un traitement par  $\beta$ -hydroxybutyrate augmente l'expression des gènes impliqués dans la résistance au stress oxydant tels que la catalase, la MnSOD, ou FOXO3A, et diminue la peroxydation lipidique comme en témoigne la baisse des taux de 4-Hydroxynonanal dans le rein de souris recevant une perfusion de  $\beta$ -hydroxybutyrate (Shimazu *et al.*, 2013).

Cette hypothèse suggère que, dans des conditions d'hyperkéronémie légère mais persistante, comme celles observées avec les inhibiteurs du SGLT2, le  $\beta$ -hydroxybutyrate est préférentiellement consommé par le cœur au dépend des acides gras. Ce déplacement de substrat diminue la consommation d'oxygène et améliore l'efficacité cardiaque. Ceci pourrait contribuer à expliquer l'effet cardioprotecteur de l'Empagliflozine (Ferrannini *et al.*, 2016).

### *IX-6 Effet sur le transport de l'oxygène*

L'augmentation de l'hématocrite observée sous traitement par inhibiteurs de SGLT2 (Mudaliar *et al.*, 2015), a suggéré un possible rôle de stimulation de l'érythropoïèse, possiblement bénéfique dans les maladies cardiovasculaires. En effet, à flux sanguin égal, un hématocrite supérieur devrait augmenter l'apport en oxygène aux tissus et contribuer à l'amélioration de l'efficacité cardiaque (Testani *et al.*, 2010 ; Ferrannini *et al.*, 2016).

### *IX-7 Effet sur la fonction endothéliale*

Des études ont montré que l'administration d'inhibiteurs de SGLT2 dans un modèle murin de diabète de type 1 induit par la streptozotocine, prévient significativement le stress oxydant vasculaire et améliore la fonction endothéliale comme en témoigne l'augmentation de la relaxation dépendante de l'endothélium à l'acétylcholine (Oelze *et al.*, 2014 ; Salim *et al.*, 2016). L'étude clinique DEFENSE qui a évalué les effets d'un inhibiteur de SGLT2 (dapagliflozine) sur la fonction endothéliale chez 80 patients atteints de DT2 à un stade précoce, a montré que la thérapie par Dapagliflozine en complément de la Metformine, a amélioré la fonction endothéliale chez les diabétiques insuffisamment contrôlé ( $HbA1c \geq 7,0\%$ ) car la FMD a été augmentée de  $1,05 \% \pm 2,59\%$  après 16 semaines de traitement. A cet égard, il a été rapporté qu'une augmentation de 1% de la FMD est associée à une réduction de 12% du risque relatif des événements cardiovasculaires (Matsuzawa *et al.*, 2015). De plus, le taux urinaire du 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine, un marqueur de stress oxydant, était significativement plus faible dans le groupe Dapagliflozine que dans le groupe Metformine, suggérant une amélioration du stress oxydant avec l'inhibiteur de SGLT2 (Shigiyama *et al.*, 2017).

A ce stade, les mécanismes impliqués dans les bénéfices CV de l'Empagliflozine demeurent largement incompris et les explications ne sont que spéculatives et doivent être explorées par d'autres études.

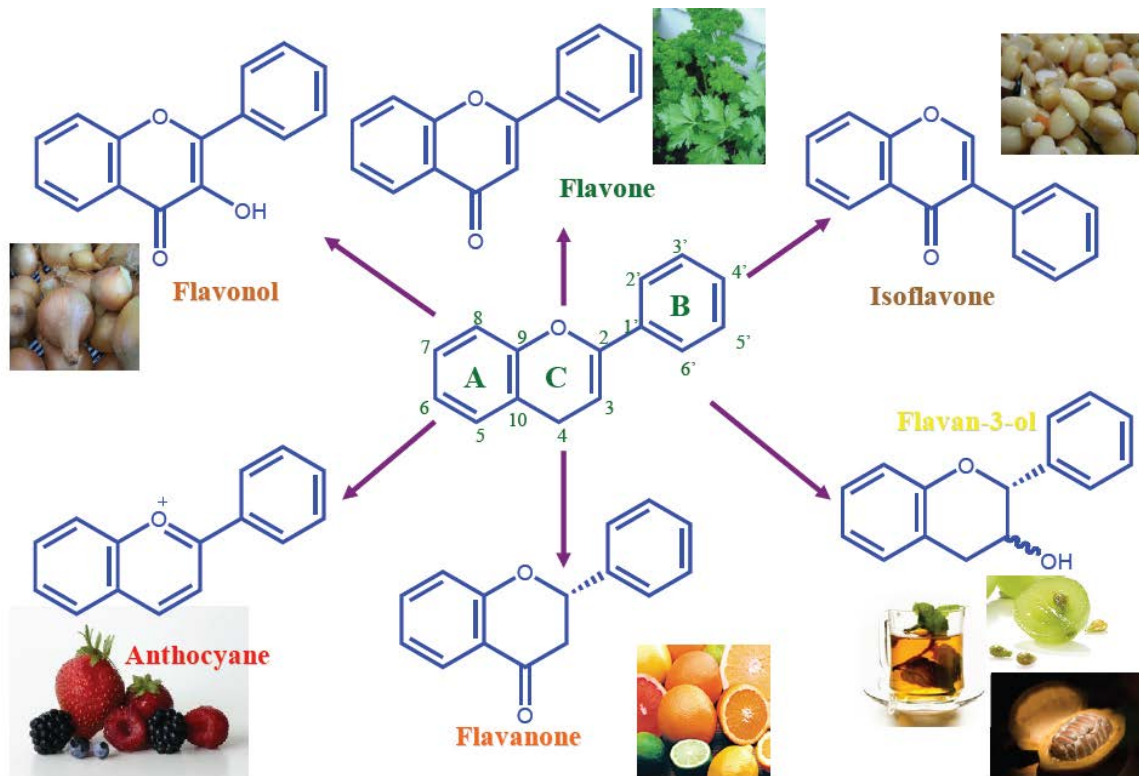
Au vu de tous ces éléments, il est dès lors tentant de spéculer que l'Empagliflozine pourrait avoir des effets bénéfiques sur la fonction vasculaire et notamment sur la cellule clé de l'homéostasie vasculaire à savoir la cellule endothéliale. Sachant que la dysfonction endothéliale est un point de départ commun pour les complications macro et microvasculaires chez les diabétiques.

## Chapitre 5 : Protection cardiovasculaire par les polyphénols

De nombreuses études épidémiologiques ont montré qu'il existait une association inverse entre la morbi-mortalité cardiovasculaire et la consommation de produits riches en polyphénols tels que les fruits, les légumes, le vin rouge, le cacao et le thé (Hertog *et al.*, 1993; Hertog *et al.*, 1995; Yamagata *et al.*, 2015; Artero *et al.*, 2015; Patel *et al.*, 2013; Corti *et al.*, 2009). En plus de leurs propriétés anti-oxydantes, les effets bénéfiques des polyphénols sur la santé cardiovasculaire ont été attribués en partie à leur effet direct sur l'endothélium (Schini-Kerth *et al.*, 2011). En effet, de nombreuses études expérimentales et cliniques montrent que les produits riches en polyphénols sont capables d'améliorer la fonction endothéliale aussi bien en situation physiologique que pathologique.

### I- Définition des polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires des plantes, décrits chimiquement comme comprenant au moins un noyau aromatique portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. Ce sont des antioxydants naturels puissants. Leurs propriétés antioxydantes sont déterminées par le nombre des groupes hydroxyle, le degré de méthylation de ces groupes, la nature, le nombre et l'emplacement des sucres attachés à la molécule; et le nombre et la nature des acides aliphatiques ou aromatiques attachés aux sucres dans la molécule (Faria *et al.*, 2013). En effet, les composés phénoliques sont généralement conjugués à des sucres ou à des acides organiques, ce qui explique la grande diversité des polyphénols, plus de 8000 composés individuels ayant été décrits. Les composés phénoliques sont généralement classés en flavonoïdes et non flavonoïdes, chaque classe possédant plusieurs sous-classes distinctes. Les flavonoïdes sont les polyphénols les plus répandues dans le règne végétal. Les sous-classes de flavonoïdes les plus présents dans l'alimentation sont les flavones, les isoflavones, les flavan-3-ols (ou catéchines), les flavanones, les flavonols et les anthocyanes. Les anthocyanes sont d'un grand intérêt nutritionnel en raison de leur apport quotidien élevé (180 à 215 mg / jour versus 23 mg / jour estimé pour d'autres flavonoïdes, dans une population aux États-Unis (Hertog *et al.*, 1993). De plus, les anthocyanes suscitent un intérêt particulier de par leurs effets protecteurs cardiovasculaires (Wallace *et al.*, 2011).



**Figure 21 : Les flavonoïdes et leurs principales sources**

## II- Les polyphénols améliorent la fonction endothéliale *in vitro* et *ex vivo*

Des études de réactivité vasculaire réalisées sur des anneaux d'artères isolés ont permis de mettre en évidence l'effet vasorelaxant de produits naturels riches en polyphénols ainsi que de composés polyphénoliques isolés. Cet effet semble être dépendant de l'endothélium car aucune relaxation n'est observée dans les anneaux dépourvus d'endothélium. En fonction du lit vasculaire, ces relaxations sont abolies en présence d'un inhibiteur de la eNOS ou des inhibiteurs des canaux potassiques SK<sub>Ca</sub> et IK<sub>Ca</sub>, démontrant la capacité des polyphénols à induire les composantes NO et EDHF. *In vitro*, les polyphénols peuvent induire l'activation de la eNOS et la formation de NO dans les CEs en culture. Cet effet implique la phosphorylation des sites activateurs : sérines 1177 et 633, et la déphosphorylation du site inhibiteur, thréonine 495, ou l'activation de la voie calcium-calmoduline. Il a été montré que la delphinidine, membre de la famille des anthocyanines, augmente les concentrations de calcium cytosolique, en libérant des stocks intracellulaires dans les cellules endothéliales à l'origine d'une production accrue de NO (Martin *et al.*, 2002).



### III- Les polyphénols améliorent la fonction endothéliale *in vivo*

L'effet bénéfique des polyphénols sur la fonction endothéliale a été mis en évidence dans plusieurs modèles expérimentaux de pathologies associée à une dysfonction endothéliale telles que l'hypertension (induite par le L-NAME, ou par l'Ang II) (Pechanova *et al.*, 2004 ; Sarr *et al.*, 2006), l'hypercholestérolémie (Wang *et al.*, 2005) et le diabète (Arrick *et al.*, 2011), mais également sur la dysfonction endothéliale liée au vieillissement. En effet, l'ingestion d'un extrait d'aubépine riche en procyanidines a été capable de prévenir le développement d'une dysfonction endothéliale chez des rats d'âge moyen (Idris-Khodja *et al.*, 2012) et l'ingestion d'un extrait polyphénolique de vin rouge a amélioré significativement la fonction endothéliale chez des rats présentant une dysfonction endothéliale liée au vieillissement déjà établie (Idris-Khodja *et al.*, 2012 ; Dal-Ros *et al.*, 2012).

Chez l'homme, plusieurs études ont montré que la consommation de polyphénols améliore la fonction endothéliale mesurée par FMD. Un effet bénéfique sur la FMD de sujets sains a été observé après la consommation journalière d'une barre de chocolat noir (46 g) riche en polyphénols (Engler *et al.*, 2004), et l'ingestion de doses croissantes de cacao (2 à 26 g) augmente la FMD de façon dose dépendante chez des sujets âgés sains ( $63 \pm 2$  ans) (Monahan *et al.*, 2011). Chez des patients présentant au moins un facteur de risque cardiovasculaire, la consommation de 100 mL d'une boisson cacaotée riche en polyphénols (176 mg de flavanols), a été capable d'améliorer la FMD, indiquant une réduction de la dysfonction endothéliale (Heiss *et al.*, 2003). Une étude interventionnelle menée par Zhu *et al.*, a montré qu'une supplémentation avec des anthocyanines pures extraits de cassis et de myrtille (320 mg / jour pendant 12 semaines) améliore la vasodilatation dépendante de l'endothélium, chez des personnes hypercholestérolémiques avec des augmentations concomitantes des concentrations des métabolites du NO et d'anthocyanines dans le sang (Zhu *et al.*, 2011).

L'effet bénéfique des polyphénols sur la fonction endothéliale implique plusieurs mécanismes incluant une formation accrue de NO et d'EDH, une réduction des EDCF, une normalisation du système angiotensine, l'inhibition de l'activité et de l'expression d'enzymes pro-oxydantes telles que la NADPH oxydase, le tout contribuant à diminuer le stress oxydant vasculaire (Schini-Kerth *et al.*, 2011).

#### IV- Biodisponibilité et distribution des polyphénols

Afin d'induire leurs effets biologiques, les polyphénols doivent d'abord atteindre leurs cibles pharmacologiques. On a longtemps cru que seuls les flavonoïdes aglycones (sans sucres liés) pouvaient traverser la paroi intestinale et atteindre la circulation sanguine en raison de l'absence de résidu de sucre conjugué et par conséquent, les flavonoïdes glycosylés étaient mal ou non absorbés. Cette conviction a été modifiée par les résultats de nombreuses études qui ont démontré l'absorption *in vivo* de flavonoïdes glycosylés. En effet, Miyazawa, Matsumoto et leurs collègues ont montré que les cyanidine-glycosides étaient détectés sous leur forme glycosylée inchangée dans le plasma et les urines de rats et des humains après administration orale de cassis (Miyazawa *et al.*, 1999 ; Matsumoto *et al.*, 2001). La détection des anthocyanes dans leurs formes glycosylées (anthocyanidines), pourrait indiquer l'implication des transporteurs du glucose dans l'absorption de ces composés *in vivo* (Cao *et al.*, 2001). Les sucres les plus couramment liés aux anthocyanidines sont : le glucose, le galactose, l'arabinose, le rutinose, le rhamnose, et le xylose, sous forme mono-, di- ou tri-saccharide (Fang *et al.*, 2014). Plusieurs équipes ont montré que la quercétine-glucoside est transportée par le transporteur SGLT1 à travers la membrane de la bordure en brosse de l'intestin grêle de rat (Walgren *et al.*, 2000 ; Wolfram, *et al.*, 2002 ; Day *et al.*, 2003). De plus, Zou et al ont montré que la transfection avec un petit ARN interférant (siRNA) spécifique pour SGLT1 ou GLUT2 diminue significativement l'absorption du cyanidine-glucoside par les cellules épithéliales intestinales humaines (Caco-2) (Zou *et al.*, 2014), suggérant l'implication des deux transporteurs dans l'absorption du cyanidine-3-*O*-glucoside. En effet, le mécanisme classique pour l'absorption intestinale du glucose implique les transporteurs SGLT1 à la membrane apicale et les transporteurs GLUT2 du côté basolatéral des entérocytes. Cependant, de récentes études ont révélé que GLUT2 pourrait être recruté à la membrane apicale des entérocytes pendant la phase post-prandiale où il est principalement fonctionnel lors de concentrations élevées de glucose luminal et peut contribuer de manière significative à l'absorption du glucose (Kellett *et al.*, 2008 ; Zheng *et al.*, 2012). Ces observations ont également été confirmées *in vivo* car des niveaux élevés de SGLT1 et GLUT2 ont été retrouvés dans l'intestin de certains modèles d'animaux diabétiques (Corpe *et al.*, 1996 ; Ait-Omar *et al.*, 2011) et suite à une alimentation prolongée riche en glucose (Margolskee *et al.*, 2007). Il est prouvé que des pools intracellulaires de SGLT1 peuvent être transloqués à la membrane plasmique des cellules Caco-2 après exposition au high glucose (Khoursandi *et al.*, 2008).

## V- Entrée des polyphénols dans les CEs

La capacité des flavonoïdes et leurs dérivés à entrer dans les cellules endothéliales a été étudiée par Youdim *et al.* en utilisant des CEs bovines (BAEC) et humaines (HAEC) incubées en présence d'un extrait de sureau (*Sambucus nigra*) contenant seulement 4 anthocyanines. Les résultats indiquent que ces composés ont été retrouvés dans la membrane plasmique et le cytosol des cellules endothéliales. La proportion d'anthocyanines incorporées dans les CE n'était pas uniforme. Une meilleure incorporation a été observée pour les dérivés mono-glycosides par rapport aux di-glycosides dans les deux compartiments. L'incorporation de l'extrait de sureau par les CEs a considérablement augmenté leur résistance au stress oxydant causé par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Youdim *et al.*, 2000).

Jin *et al.* ont montré que la delphinidine-3-*O*-glucoside, inhibait l'apoptose et le stress oxydant induits par les LDL oxydés dans les HUVEC. La suppression du SGLT1 par siRNA ou son inhibition par la phlorizine a significativement diminué d'environ 96%, l'absorption de la delphinidine-3-*O*-glucoside par HUVEC et prévenu son effet protecteur sur la fonction endothéliale, suggérant son entrée dans les CEs via les SGLT1 (Jin *et al.*, 2013).

## VI- Polyphénols et diabète

Le régime alimentaire est considéré comme une stratégie non pharmacologique utile pour le contrôle de la glycémie (Marin-Penalver *et al.*, 2016). Plusieurs études prospectives et transversales dans différentes populations ont montré que la consommation de polyphénols comme les anthocyanines a été associée à un risque inférieur de DT2 (Guo *et al.*, 2016). Une étude de trois cohortes réalisée aux États-Unis sur 199 980 sujets, a montré qu'un apport élevé d'anthocyanines était significativement associé à un risque plus faible de diabète (HR 0,85 ; CI 95% 0,80, 0,91) (Muraki *et al.*, 2013 ; Wedick *et al.*, 2012). De plus, la consommation d'aliments riches en anthocyanes a été associée à des effets bénéfiques sur les biomarqueurs métaboliques chez l'homme tels que les concentrations de glucose postprandiales, d'insuline, des acides gras libres et des hormones gastro-intestinales (GIP et GLP-1) (Johnston *et al.*, 2002 ; Törrönen *et al.*, 2013).

Il existe de plus en plus de preuves en faveur d'un rôle potentiel des anthocyanines alimentaires dans l'homéostasie du glucose. Cependant un manque de compréhension des mécanismes sous-jacents persiste.

Des études utilisant des cellules Caco-2 comme modèle *in vitro* de l'intestin grêle et des ovocytes *de xenope* exprimant les différents transporteurs de glucose, montrent une inhibition de l'absorption du glucose par des extraits d'anthocyanine. Johnston *et al.*, ont réalisé l'une des premières études suggérant une inhibition compétitive par les polyphénols, des transporteurs SGLT1 et GLUT2 dans un modèle cellulaire de l'épithélium intestinal humain (Johnston *et al.*, 2005). Manzano et Williamson ont montré qu'un extrait de fraise est capable d'inhiber l'entrée de glucose apical (transport médié par SGLT1 et GLUT2) et basolatéral (transport médié par GLUT2) dans les cellules Caco-2 (Manzano *et al.*, 2010). Une étude récente a suggéré que la delphinidine réduit l'absorption de glucose dans le jéjunum de la souris, cet effet était médié par les transporteurs SGLTs, car l'ajout de la delphinidine diminue l'entrée de glucose (Hidalgo *et al.*, 2017). Ces résultats suggèrent que les polyphénols peuvent influencer le transport du glucose à travers les cellules intestinales, modulant ainsi le taux de glucose dans le flux sanguin. Une autre étude *in vitro* dans les cellules Caco-2, en testant différentes concentrations d'un extrait de cassis purifié (0,15-1,2 mM) a également montré une inhibition aiguë de l'absorption de glucose avec un  $CI_{50}$  de 0,3 mM. Plusieurs études ont montré que les polyphénols régulent l'absorption de glucose dans les cellules Caco-2 : les polyphénols-glucosides agissant principalement sur le transport dépendant du sodium tandis que les aglycones correspondants régulent le transport facilité.

Plus récemment, Alzaid *et al.* ont montré que l'exposition aiguë (15 min) des cellules Caco-2 à un extrait de baies riches en anthocyanines, diminue considérablement l'absorption du glucose à la fois facilitée et dépendante du sodium. L'exposition à plus long terme (16 h) a considérablement diminué le niveau d'ARNm de SGLT1 et de GLUT2, de la protéine GLUT2 mais pas SGLT1. Ces résultats suggèrent deux modes d'action possibles par lesquels les polyphénols de baies pourraient réguler le transport intestinal de glucose: 1) une interaction physique avec les transporteurs de glucose, 2) une modulation génomique de l'expression des transporteurs (Alzaid *et al.*, 2013). D'autres travaux ont également montré que les polyphénols du Yerba Maté ont diminué l'ARNm du SGLT1 dans l'intestin de rats rendus diabétiques par l'alloxan (Oliveira *et al.*, 2008).

Il a été rapporté que les augmentations fréquentes des concentrations élevées de glucose postprandial augmentent le risque de DT2 et de MCV en induisant un stress oxydant vasculaire et une glycation des protéines (Blaak *et al.*, 2012).

## Hypothèses de travail

L'ensemble des données de la littérature suggère que la dysfonction endothéliale constitue un évènement précoce dans le développement des maladies cardiovasculaires. Alors que le diabète est considéré comme un facteur de risque cardiovasculaire majeur indépendant, les études cliniques analysant l'intérêt d'un contrôle glycémique intensif n'ont pas montré de bénéfice sur la mortalité cardiovasculaire. Les thérapies prenant en charge que la baisse de la glycémie ne sont bénéfiques sur le plan CV qu'à long terme. En effet, l'étude UKPDS était la seule en faveur d'une réduction du risque d'événements CV, cependant cet effet a été observé après 20 ans de suivi (10 ans en interventionnel et 10 ans en observationnel). Seule l'étude STENO-2 avec une prise en charge multiple des facteurs de risques, en plus de l'hyperglycémie, a montré un bénéfice à moyen terme, sur la mortalité cardiovasculaire (Gaede *et al.*, 2003). Récemment, l'étude EMPA-REG a montré une réduction remarquable et précoce de la mortalité CV chez les diabétiques à haut risque CV traités par Empagliflozine, un inhibiteur sélectif de SGLT2.

De nombreuses preuves expérimentales et cliniques indiquent que les complications micro et macrovasculaires du diabétique sont causées par la dysfonction endothéliale induite par l'hyperglycémie et par les facteurs de risques associés au diabète. Or, la sénescence endothéliale joue un rôle majeur dans l'induction de la dysfonction endothéliale.

Dans ce contexte, la question de l'impact du vieillissement endothélial sur la fonction vasculaire est centrale pour développer des stratégies capables d'atténuer l'effet du vieillissement du système vasculaire et retarder le développement de maladies cardiovasculaires.

L'objectif premier de ce travail a donc été d'établir des modèles d'étude *in vitro* et *ex vivo* de la sénescence endothéliale dans des conditions expérimentales mimant le vieillissement physiologique, d'une part, ou accéléré par exposition à des concentrations élevées de glucose d'autre part.

Un deuxième objectif a été d'étudier les mécanismes sous-jacents à la sénescence et la dysfonction endothéliales, et d'identifier les acteurs moléculaires constituant des cibles privilégiées pour la prévention du vieillissement vasculaire.

Cette démarche est rassemblée dans trois articles successifs :

**Article 1 :** Ce travail examine le rôle du système angiotensine local dans l'induction de la sénescence endothéliale *in vitro* et l'effet protecteur d'un extrait de Crataegus WS1442, riche en polyphénols antioxydants et puissants stimulateurs de la formation endothéliale de NO.

**Article 2 :** Ce travail a évalué le rôle des transporteurs SGLT2 dans la glucotoxicité endothéliale, en utilisant un inhibiteur sélectif des SGLT2, l'Empagliflozine comme modulateur pharmacologique des mécanismes moléculaires sous-jacents.

**Article 3 :** Cette étude a utilisé une approche pharmacologique pour moduler le vieillissement endothélial à l'aide d'un extrait de cassis contenant 4 anthocyanines majeurs et les mécanismes moléculaires sous-jacents.

# **Article 1**

**Article 1** : Publié dans Journal of Gerontology.

The redox-sensitive induction of the local Angiotensin System promotes both premature and replicative endothelial senescence preventive effect of a standardized Crataegus extract. **Sonia Khemais-Benkhiat\***, Noureddine Idris-Khodja\*, Thais Porto Ribeiro\*, Grazielle Caroline Silva, Malak Abbas, Marouane Kheloufi, Jung-Ok Lee, Florence Toti, Cyril Auger, Valérie B. Schini-Kerth. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2016 Dec; 71(12):1581-1590. Epub 2015 Dec 15.

L'âge est un facteur de risque cardiovasculaire majeur (Lakatta et Levy, 2003a ; Shih *et al.*, 2011). La sénescence endothéliale associée au vieillissement favorise la dysfonction endothéliale qui constitue un facteur clé dans la pathogenèse des maladies vasculaires chez le sujet âgé. Plusieurs études ont suggéré que le système angiotensine joue un rôle important dans la dysfonction endothéliale liée au vieillissement. En effet, des niveaux élevés d'expression de l'Ang II tissulaire et du récepteur AT-1 ont été observés dans des aortes de rats âgés (Idris Khodja *et al.*, 2012) et dans des artères mammaires internes de sujets âgés (Dzau *et al.*, 2001). De plus, l'inhibition du système Angiotensine par les inhibiteurs de l'enzyme de conversion, ou par les antagonistes des récepteurs AT-1, a réduit la dysfonction endothéliale liées à l'âge chez le rat (Dzau *et al.*, 2001; Kansui *et al.*, 2002; Mukai *et al.*, 2002). Cependant, les mécanismes d'activation du système angiotensine lors du vieillissement ne sont pas encore entièrement compris.

Les produits naturels riche en polyphénols ont montré des effets bénéfiques sur la dysfonction endothéliale liée au vieillissement, de par leurs propriétés antioxydante et la stimulation de la formation de NO. L'ingestion d'un extrait d'aubépine riche en procyanidines a prévenu le développement d'une dysfonction endothéliale chez des rats d'âge moyen (Idris-Khodja *et al.*, 2012).

L'objectif de cette étude est de déterminer le rôle du système angiotensine local dans l'induction de la sénescence endothéliale, caractériser les mécanismes moléculaires sous-jacents et déterminer si un tel effet peut être prévenu par un extrait de Crataegus riche en polyphénols.

Deux modèles de sénescence ont été développés *in vitro*, un modèle de sénescence répllicative où les CE à P0 sont soumis à plusieurs passages à intervalles réguliers (P1 à P4) pendant 3



semaines, et un modèle de sénescence prématurée induit par l'inhibition de la formation de NO en traitant les CEs jeunes à P1 par le N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME), un inhibiteur de la eNOS.

Original Article

# The Redox-sensitive Induction of the Local Angiotensin System Promotes Both Premature and Replicative Endothelial Senescence: Preventive Effect of a Standardized *Crataegus* Extract

Sonia Khemais-Benkhiat,<sup>\*,1</sup> Noureddine Idris-Khodja,<sup>\*,1</sup>  
Thais Porto Ribeiro,<sup>\*,1</sup> Grazielle Caroline Silva,<sup>1</sup> Malak Abbas,<sup>1,2</sup> Marouane Kheloufi,<sup>1</sup>  
Jung-Ok Lee,<sup>1</sup> Florence Toti,<sup>1</sup> Cyril Auger,<sup>1</sup> and Valérie B. Schini-Kerth<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR CNRS 7213, Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Illkirch, France. <sup>2</sup>EA 7293 Stress Vasculaire et Tissulaire en Transplantation, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Illkirch, France.

\*These authors contributed equally to this work.

Address correspondence to Valérie B. Schini-Kerth, PhD, UMR CNRS 7213, Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg, Illkirch, France, 74, route du Rhin, BP 60024, 67401 Illkirch, France. Email: [valerie.schini-kerth@unistra.fr](mailto:valerie.schini-kerth@unistra.fr)

Received September 1, 2015; Accepted November 3, 2015

**Decision Editor:** Rafael de Cabo, PhD

## Abstract

Endothelial senescence, characterized by an irreversible cell cycle arrest, oxidative stress, and downregulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), has been shown to promote endothelial dysfunction leading to the development of age-related vascular disorders. This study has assessed the possibility that the local angiotensin system promotes endothelial senescence in coronary artery endothelial cells and also the protective effect of the *Crataegus* extract WS1442, a quantified hawthorn extract. Serial passaging from P1 to P4 (replicative senescence) and treatment of P1 endothelial cells with the eNOS inhibitor L-NAME (premature senescence) promoted acquisition of markers of senescence, enhanced ROS formation, decreased eNOS expression, and upregulation of angiotensin-converting enzyme (ACE) and AT1 receptors. Increased SA- $\beta$ -gal activity and the upregulation of ACE and AT1R in senescent cells were prevented by antioxidants, an ACE inhibitor, and by an AT1 receptor blocker. WS1442 prevented SA- $\beta$ -gal activity, the downregulation of eNOS, and oxidative stress in P3 cells. These findings indicate that the impairment of eNOS-derived nitric oxide formation favors a pro-oxidant response triggering the local angiotensin system, which, in turn, promotes endothelial senescence. Such a sequence of events can be effectively inhibited by a standardized polyphenol-rich extract mainly by targeting the oxidative stress.

**Key Words:** Local angiotensin system—Endothelial senescence—eNOS—Oxidative stress—p53/p21 pathway—*Crataegus* extract

Endothelial cell senescence has been suggested to contribute to aging-related endothelial dysfunction, which plays a key role in the initiation and/or progression of atherosclerosis, hypertension, and other cardiovascular diseases (1–3). Endothelial cell senescence is characterized by an irreversible cell cycle arrest with enlarged, flattened cell morphology and increased granularity and vacuolization (4). Nevertheless, the cells remain viable and metabolically active (5). Senescence can be induced in vitro by serially passaging endothelial cells (replicative

senescence) or prematurely by a variety of cellular stresses such as oxidative stress, angiotensin II, high glucose, radiations, and DNA damage (stress-induced premature senescence) (6). Ultimately, almost all of these signals promoting senescence lead to the activation of the p53/p21 and/or the p16/retinoblastoma protein pathways to inhibit cell cycle (6). Endothelial cell senescence has also been shown to occur in vivo in several types of pathological arteries. Indeed, an increased number of senescent endothelial cells, as assessed using

senescence-associated- $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) as a histochemical marker, has been observed overlying atherosclerotic plaques of human coronary arteries and thoracic aortas of patients with ischemic heart diseases (7). High levels of vascular senescence have also been observed in the aortic arch of spontaneously hypertensive rats (8) and in the aorta of diabetic rats (9). Studies with cultured cells have indicated that endothelial cell senescence is associated with the downregulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), the induction of a proinflammatory state, and DNA damages (10). In addition, the overexpression of endothelial p53 induced endothelial dysfunction and decreased nitric oxide (NO) bioavailability in rat aortic sections and the downregulation of eNOS in cultured endothelial cells (11).

Oxidative stress has been suggested to be a major contributor to the development of aging-related endothelial dysfunction by reducing the bioavailability of both the endothelial NO and the endothelium-dependent hyperpolarization response, and possibly also by inducing endothelium-dependent contractile responses (12–14). Indeed, a high level of oxidative stress is observed throughout the aged arterial wall, which has been suggested to involve several sources of reactive oxygen species (ROS) including nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase, mitochondria, uncoupled eNOS, and cyclooxygenases (12,13,15). Moreover, previous studies have shown that the NADPH oxidase inhibitor apocynin improved aging-related blunted endothelium-dependent relaxations in human microvessels, mice aortas, and in the rat mesenteric artery (12,14,16,17), and the antioxidant vitamin C enhanced the blunted acetylcholine-induced forearm blood flow in old subjects (15). An improved aging-related endothelial dysfunction and vascular oxidative stress have also been observed in response to several natural antioxidant treatments including chronic intake of grape-derived polyphenols and a polyphenol-rich *Crataegus* extract (13,17,18). Besides their antioxidant properties, these polyphenol-rich products may also improve the endothelial dysfunction by inducing a sustained PI3-kinase/Akt-dependent activation of eNOS subsequent to the phosphorylation of the activator site Ser1177, and possibly also by increasing the expression of eNOS (19,20).

Several lines of evidence suggest that the angiotensin system is a major contributor to the aging-related endothelial dysfunction. Indeed, both angiotensin-converting enzyme (ACE) and AT1 receptors are upregulated within the old arterial wall, and treatments with either an ACE inhibitor or an AT1 receptor antagonist prevented aging-related endothelial dysfunction (21–23). Therefore, the aim of the present study was to determine the possibility that the local angiotensin system triggers the redox-sensitive induction of endothelial senescence using a model of replicative senescence and of premature senescence induced by the inhibition of the eNOS-derived NO formation in cultured porcine coronary artery endothelial cells and to determine whether such an effect is prevented by a polyphenol-rich quantified *Crataegus* extract.

## Material and Methods

### *Crataegus* Special Extract WS1442

*Crataegus* WS1442 is a special dry extract obtained from leaves with flowers of selected hawthorn species (*Crataegus oxyacantha*/*Crataegus monogyna*) by extraction with 45% (w/w) aqueous ethanol (drug/extract ratio 4–6.6:1). The extract is adjusted to a content of 17.3%–20.1% oligomeric procyanidins.

### Chemicals

Unless stated otherwise, all chemicals and solvents were from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie SARL, St Quentin Fallavier, France).

## Isolation and Culture of Coronary Artery Endothelial Cells

Pig hearts were collected from the local slaughterhouse (COPVIAL, Holtzheim, France) and endothelial cells were isolated from the left circumflex coronary arteries as described previously (24). Briefly, left circumflex coronary arteries were excised from fresh heart, cleaned of adhesive conjunctive tissues, and the remaining blood was flushed with cold phosphate-buffered saline (PBS) without calcium. Endothelial cells were isolated by collagenase treatment (type I, Worthington Biochemicals Corp., Lakewood, NJ) at 1 mg/mL for 12 minutes at 37°C. Endothelial cells were cultured in culture dishes containing medium MCDB 131 (Life Technologies SAS, St Aubin, France) and 15% fetal serum supplemented with penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 U/mL), fungizone (250 mg/mL), and L-glutamine (2 mM, all from Lonza, Levallois-Perret, France) and grown for 48–72 hours (passage 0). To prepare cultures for passages 1 to 4, endothelial cells were detached with trypsin-ethylenediamine-tetraacetic acid (trypsin-EDTA; Life Technologies SAS) and further passaged at a ratio of 1:3 at regular intervals until senescence was reached. The medium was changed every 48 hours.

## Fluorescence Detection of SA- $\beta$ -gal Activity

To measure SA- $\beta$ -gal activity by flow cytometry, we used the fluorogenic substrate C<sub>12</sub>FDG (5-dodecanoylamino fluorescein Di- $\beta$ -D-galactopyranoside, Invitrogen, Life Technologies SAS). This compound is a membrane permeable, nonfluorescent substrate of  $\beta$ -galactosidase, which after hydrolysis of the galactosyl residues emits green fluorescence and remains confined within the cell. Endothelial cells were pretreated with chloroquine (300  $\mu$ M) for 1 hour to increase the internal pH of lysosomes. Chloroquine is a weak base that accumulates in lysosomes, raising the pH to approximately 6. C<sub>12</sub>FDG (33  $\mu$ M) was then added to the pretreatment medium (without phenol red), and the incubation was continued for 1 hour. At the end of the incubation period, cultures were washed with ice-cold PBS. Cells were resuspended following trypsinization and analyzed immediately using a flow cytometer (FACScan, BD Biosciences, San Jose, CA). Data were acquired and analyzed with Cellquest software (Becton Dickinson). Light scatter parameters were used to eliminate dead cells and subcellular debris. The C<sub>12</sub>-fluorescein signal was measured using the FL1 detector and SA- $\beta$ -gal activity was estimated using the median fluorescence intensity of the population. Autofluorescence, as assessed in parallel in cells not exposed to C<sub>12</sub>FDG, was negligible.

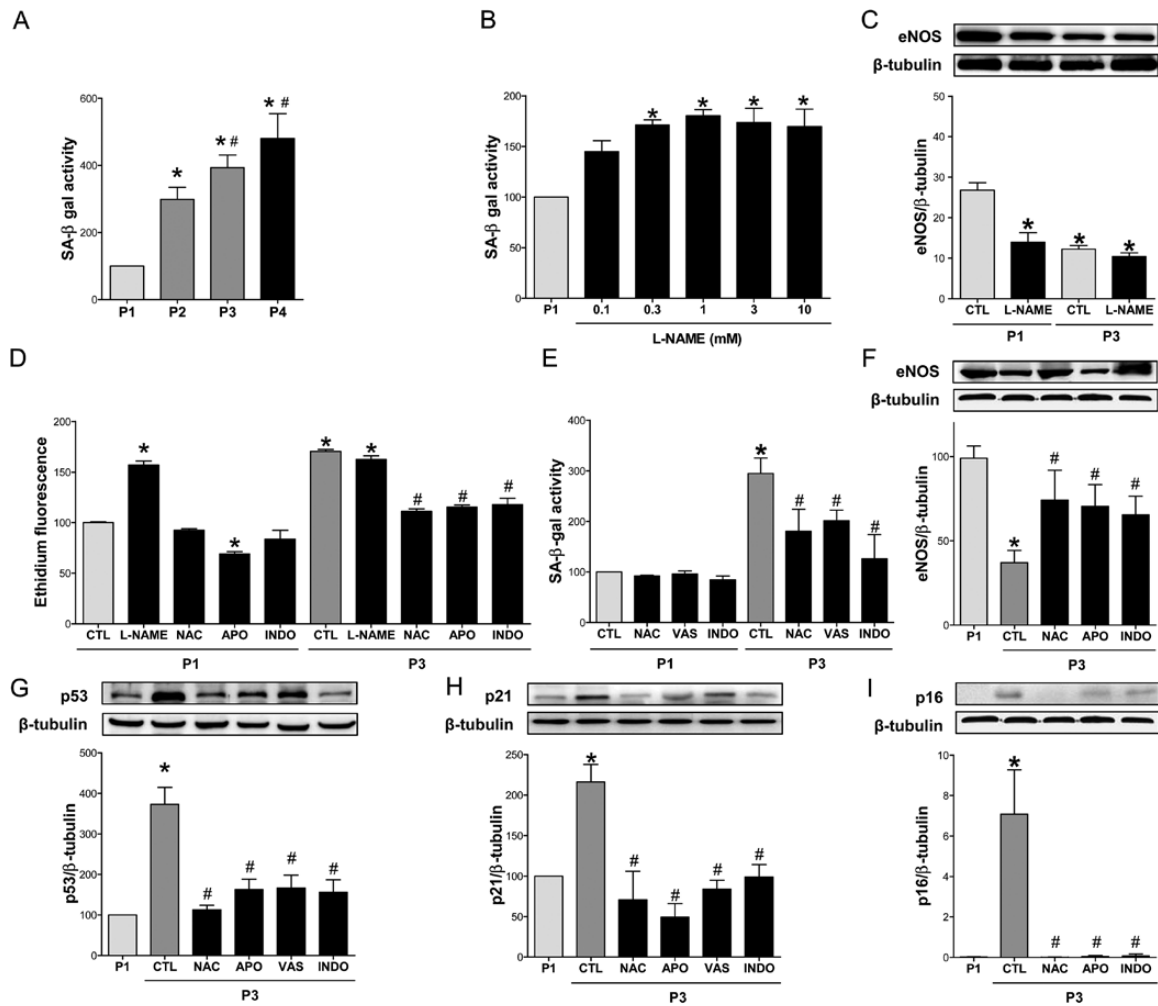
## Determination of Oxidative Stress in Endothelial Cells

The redox-sensitive fluorescent dye dihydroethidium (DHE) was used to evaluate the in situ formation of ROS. Endothelial cells were treated with DHE (5  $\mu$ M) for 30 minutes at 37°C in a light-protected manner to determine the in situ formation of ROS. To determine the source of ROS, endothelial cells were incubated with several inhibitors including L-NAME (NO synthase inhibitor, 1 mM), N-acetyl cysteine (NAC, a non specific antioxidant, 1 mM), apocynin (a NADPH oxidase inhibitor, 300  $\mu$ M), or indomethacin (a cyclooxygenase inhibitor, 30  $\mu$ M) for 30 minutes at 37°C before the addition of DHE. Endothelial cells were then washed and analyzed for ethidium fluorescence using a flow cytometer (FACScan, BD Biosciences). Data were acquired and analyzed with Cellquest software.

**Western Blotting**

After treatment, cells were washed twice with PBS and then lysed in extraction buffer (composition in mM: Tris/HCl 20 [pH 7.5], NaCl 150, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1, sodium pyrophosphate 10, NaF 20, okadaic acid 0.01, a tablet of protease inhibitor [Complete, Roche], and 1% Triton X-100 [Euromedex, Souffelweyershem, France]). Total proteins (10 or 30 µg) were separated on 8% or 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels at 100V for 2 hours and transferred electrophoretically in polyvinylidene difluoride membranes (GE healthcare, Vélizy-Villacoublay, France) at 100V for 2 hours. Membranes were incubated with blocking buffer (Tris-buffered saline solution and 0.1% Tween 20 [Euromedex]) containing 3% bovine serum albumin for 1 hour. For detection of proteins, membranes were incubated with the respective primary antibody: rabbit polyclonal anti-eNOS

(diluted 1:1.000; BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), rabbit polyclonal anti-p53 (diluted 1:1.000; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), mouse monoclonal anti-p21 (diluted 1:500; Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal anti-p16 (diluted 1:500; Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal anti-gp91 phox (diluted 1:1.000; Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal anti-p47 phox (diluted 1:1.000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA), rabbit polyclonal anti-p22 phox (diluted 1:1.000; Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal anti-COX-1 (diluted 1:1.000; Cell Signaling Technology), mouse monoclonal anti-COX-2 (diluted 1:500; BD Biosciences), rabbit polyclonal anti-ACE (diluted 1:1000; Abbiotec), rabbit polyclonal anti-AT1 (diluted 1:1000; Santa Cruz Technology), mouse monoclonal anti-β-tubulin (diluted 1:3.000; Sigma-Aldrich), or mouse monoclonal α-actin (diluted 1:1.000;



**Figure 1.** Role of eNOS-derived nitric oxide (NO) and ROS formation in replicative and premature endothelial cell senescence. (A) Flow cytometry detection of SA-β-gal activity in serially passaged porcine coronary artery endothelial cells from P1 to P4. \**p* < .05 versus P1 cells and #*p* < .05 versus P2 cells (*n* = 4). (B) SA-β-gal activity in cultured young (P1) cells treated with or without increasing concentrations of L-NAME. \**p* < .05 versus control (*n* = 4). (C) Representative Western blots (upper panels) showing eNOS expression levels in young cells (P1) and senescent cells (P3) treated or not with L-NAME (NO synthase inhibitor, 1 mM) and corresponding cumulative data (lower panels). \**p* < .05 versus control P1 cells (*n* = 4). (D) Young (P1) and senescent (P3) endothelial cells were treated or not with either L-NAME (NO synthase inhibitor, 1 mM), N-acetyl cysteine (NAC, an antioxidant, 1 mM), apocynin (APO, a NADPH oxidase inhibitor, 300 µM), or indomethacin (INDO, a cyclooxygenase inhibitor, 30 µM) before determination of ROS formation by addition of the redox-sensitive fluorescent dye dihydroethidium (DHE) for 30 minutes at 37 °C. Thereafter, ethidium fluorescence was determined by flow cytometry. \**p* < .05 versus control P1 cells and #*p* < .05 versus control P3 cells (*n* = 3 for P1 cells, *n* = 5 for P3 cells). (E) Young (P1) and senescent (P3) endothelial cells were treated or not with either NAC (1 mM), VAS-2870 (VAS, a NADPH oxidase inhibitor, 300 µM), or INDO (30 µM) before detection of SA-β-gal activity by flow cytometry. \**p* < .05 versus control P1 cells and #*p* < .05 versus control P3 cells (*n* = 3 for P1 cells, *n* = 5 for P3 cells). (F–I) Representative Western blots (upper panels) showing expression levels of (F) eNOS, (G) p53, (H) p21, and (I) p16 in young cells (P1) and senescent cells (P3) treated or not with either NAC (1 mM), APO (300 µM), or INDO (30 µM) and corresponding cumulative data (lower panels). \**p* < .05 versus control P1 cells (*n* = 3–4).

Sigma-Aldrich) overnight at 4°C. After washing, membranes were incubated with the secondary antibody (peroxidase-labeled anti-rabbit and anti-mouse immunoglobulin G, dilution of 1:5000; Cell Signaling Technology) at room temperature for 60 minutes. Prestained markers (Invitrogen) were used for molecular mass determinations. Immunoreactive bands were detected by enhanced chemiluminescence (GE healthcare). The amount of protein in each lane was normalized to the housekeeping protein,  $\alpha$ -actin or  $\beta$ -tubulin before the analysis was performed.

### Statistical Analysis

Data are presented as mean  $\pm$  SEM of  $n$  different experiments. Mean values were compared using Student's paired  $t$  test or an analysis of variance followed by the post hoc Bonferroni test to identify significant differences between treatments, using GraphPad Prism (version 5 for Microsoft windows. GraphPad software, Inc, San Diego, CA). The difference was considered to be significant when the  $p$  value was less than .05.

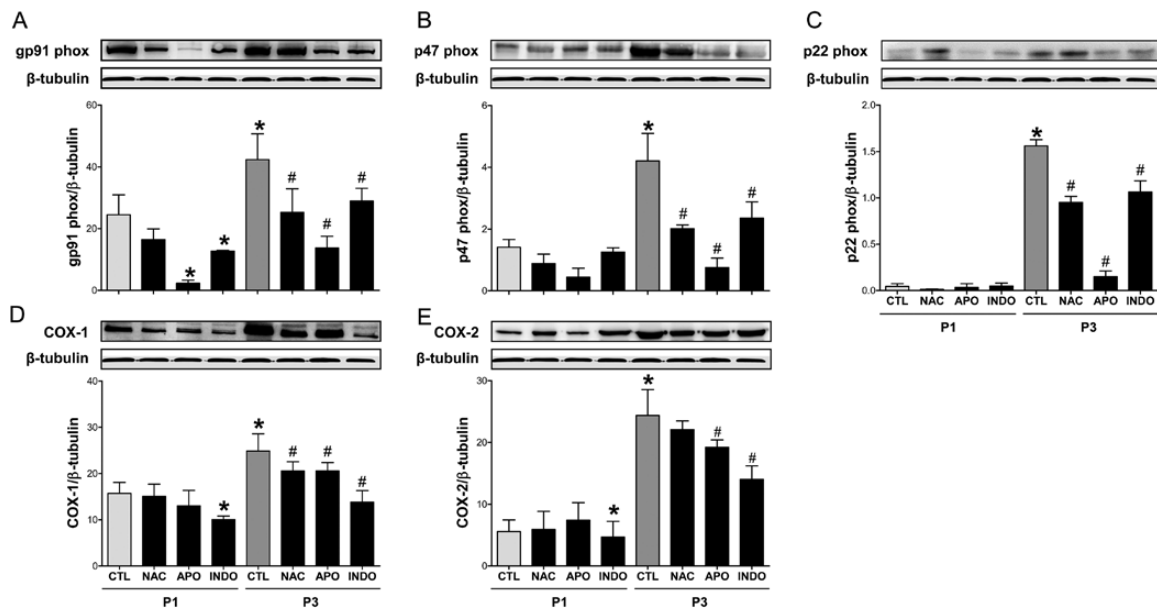
## Results

### Redox-sensitive Induction of Replicative and Premature Endothelial Senescence

Serial passaging of porcine coronary artery endothelial cells up to passage 4 (P4) resulted in a progressive induction of senescence as assessed using SA- $\beta$ -gal by flow cytometry detection of C<sub>12</sub>-fluorescein fluorescence (Figure 1A). Because a NO donor (DETA-NO) and transfection with eNOS in cultured endothelial cells have been shown to decrease the number of senescent cells (25), the possibility that the basal formation of eNOS-derived NO counteracts endothelial senescence was assessed. Treatment of endothelial cells at P1 with increasing concentrations of the eNOS inhibitor L-NAME

(0.1–10 mM) significantly increased SA- $\beta$ -gal activity (Figure 1B). In addition, the level of eNOS protein was markedly reduced in both replicative endothelial senescence at P3 and also in L-NAME-induced premature endothelial senescence at P1 (Figure 1C). In contrast, the L-NAME treatment did not affect the low protein level of eNOS in P3 senescent endothelial cells (Figure 1C). Thus, the endogenous eNOS-derived NO formation is a key mechanism counteracting the induction of senescence.

Because oxidative stress has been shown to be an important inducer of cell senescence and the formation of eNOS-derived NO is an important mechanism limiting oxidative stress, by chemically reacting and destroying superoxide anions (26,27), the role of oxidative stress in both replicative and premature endothelial senescence was determined by flow cytometry using the redox-sensitive fluorescent probe dihydroethidium. The ethidium fluorescence signal was markedly increased in cells at P3 compared with cells at P1, and this effect was prevented by the antioxidant NAC (Figure 1D). In order to determine the source of ROS, endothelial cells were treated with pharmacological inhibitors of the major sources of ROS before DHE staining. The increased ethidium fluorescence signal was markedly reduced by apocynin (a NADPH oxidase inhibitor) and indomethacin (a cyclooxygenase inhibitor) and was not affected by L-NAME (Figure 1D), suggesting the involvement predominantly of NADPH oxidase and cyclooxygenases. Indeed, an overexpression of the NADPH oxidase subunits gp91 phox, p47 phox, and p22 phox and of COX-1 and COX-2 was observed in P3 cells as assessed by Western blotting (Figure 2). The fact that NAC, NADPH oxidase inhibitors (apocynin and VAS-2870), and indomethacin significantly reduced SA- $\beta$ -gal activity, and also the increased expression of the senescence markers (p53, p21, and p16), the NADPH oxidase subunits, and COX-1 and 2 (except the increased COX-2 level, which was not affected by NAC) and the downregulation of eNOS in P3 endothelial cells, indicates



**Figure 2.** Characterization of the redox-sensitive upregulation of the expression of NADPH oxidase subunits and cyclooxygenases in replicative endothelial cell senescence. (A–E) Young (P1) and senescent (P3) endothelial cells were treated or not with either N-acetyl cysteine (NAC, an antioxidant, 1 mM), apocynin (APO, a NADPH oxidase inhibitor, 300  $\mu$ M), or indomethacin (INDO, a cyclooxygenase inhibitor, 30  $\mu$ M) before determination of protein expression by Western blotting. Results are presented as representative immunoblots (upper panels) and corresponding cumulative data (lower panels) for expression of NADPH oxidase subunits (A) gp91 phox, (B) p47 phox, and (C) p22 phox and cyclooxygenase isoforms (D) COX-1 and (E) COX-2. \* $p < .05$  versus control P1 cells and # $p < .05$  versus control P3 cells ( $n = 3$ ).

that oxidative stress is an early key event promoting the imbalance by reducing the influence of the protective eNOS-derived NO pathway and increasing that of the NADPH oxidase- and COX-dependent pro-senescent pathways (Figures 1 and 2). In addition, the level of oxidative stress in cells at P1 was not affected by NAC and indomethacin, whereas it was significantly increased by the eNOS inhibitor and slightly reduced by apocynin, suggesting that eNOS-derived NO controls the basal level of oxidative stress and that NADPH oxidase appears to be a major source of ROS in nonsenescent endothelial cells.

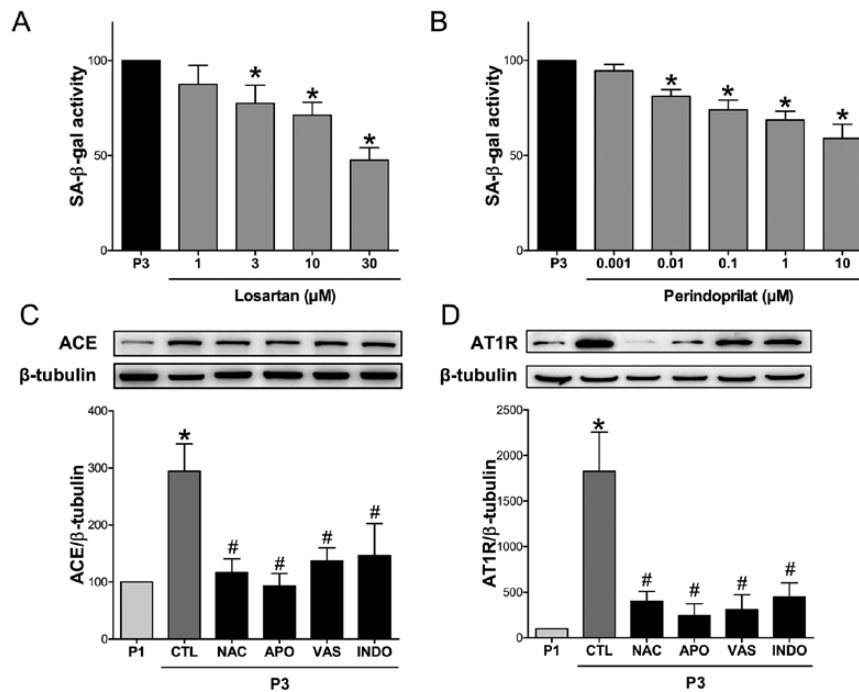
### The Local Redox-sensitive Angiotensin System Promotes Endothelial Replicative and Premature Senescence

Because oxidative stress has been shown to upregulate the expression of both ACE and ATR1 in endothelial and vascular smooth muscle cells (28,29), the role of the local angiotensin system in the induction of both replicative and premature endothelial senescence was determined. Exposure of endothelial cells to either the ACE inhibitor perindoprilat or the AT1R blocker losartan concentration-dependently decreased SA-β-gal activity in endothelial cells at P3 and in L-NAME-treated P1 endothelial cells (Figures 3 and 4A). Both losartan and perindoprilat also prevented the L-NAME-induced upregulation of p16 and p21 but not of p53 protein levels (Figure 4E–G). In addition, a significant upregulation of both ACE and AT1 receptor protein levels was observed in replicative senescent endothelial cells at P3 and in premature L-NAME-treated P1 senescent endothelial cells (Figures 3C,D and 4C,D). The fact that

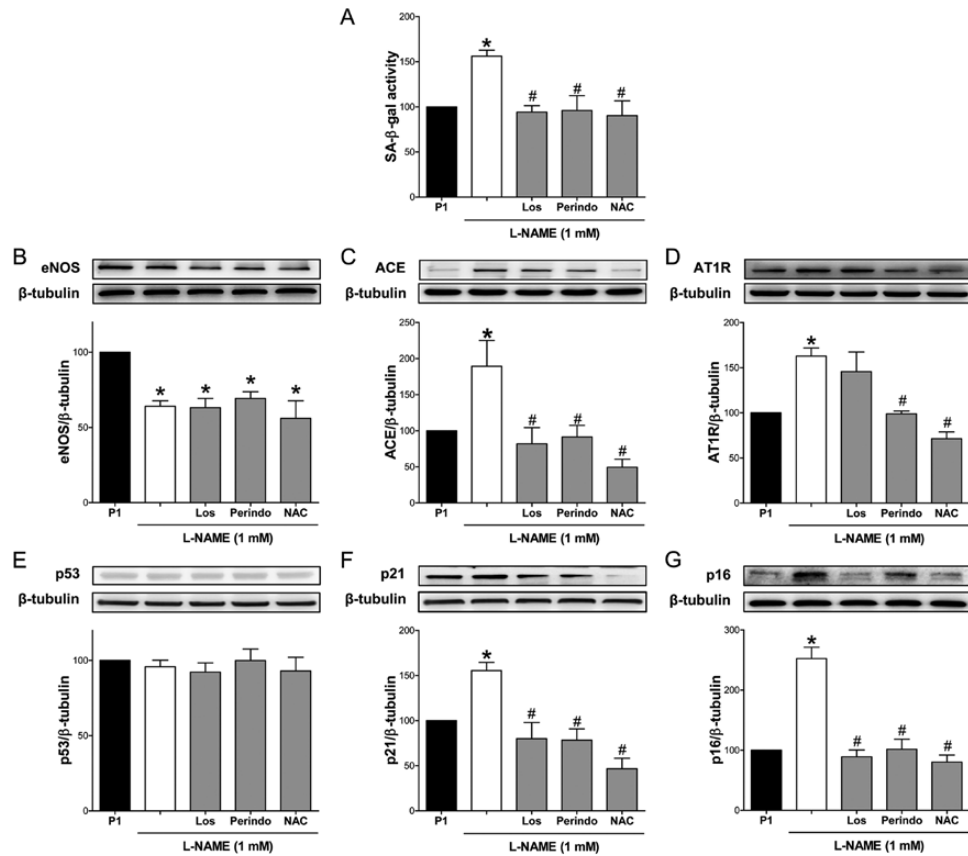
the antioxidant treatments (NAC, NADPH oxidase inhibitor, and COX inhibitor) prevented the upregulation of ACE and AT1 receptors in senescent endothelial cells indicates that oxidative stress is acting upstream of the local angiotensin system (Figures 3C,D and 4C,D). Moreover, perindoprilat and losartan prevented the upregulation of ACE and AT1 receptor protein levels in L-NAME-treated P1 senescent endothelial cells, suggesting that the local angiotensin system promotes in a feed forward positive manner its own expression (Figure 4C, D). In contrast to markers of senescence and of the angiotensin system, perindoprilat and losartan did not significantly affect the downregulation of the eNOS protein level in L-NAME-treated P1 senescent endothelial cells (Figure 4B).

### *Crataegus* Extract Delays Replicative Endothelial Senescence by Preventing the Oxidative Stress-induced Downregulation of the eNOS Pathway

Because oxidative stress is a determinant event triggering the cascade of events leading to replicative and premature endothelial senescence, experiments were performed to evaluate the potential protective effect of the *Crataegus* special extract WS1442. This polyphenol-rich quantified hawthorn extract has been shown previously to be a potent activator of the eNOS-derived NO formation in isolated coronary artery rings and to prevent aging-related endothelial dysfunction and oxidative stress (18,30). The *Crataegus* extract concentration-dependently reduced the increased SA-β-gal activity in cells at P2, P3, and P4 (Figure 5A). A significant reduction in SA-β-gal activity was already observed in response to a concentration as low as 1 μg/mL of the *Crataegus* extract in cells at P3 and



**Figure 3.** The local redox-sensitive angiotensin system promotes endothelial replicative and premature senescence. (A,B) SA-β-gal activity in senescent endothelial cells (P3) treated or not with increasing concentrations of either (A) an AT1R antagonist (Losartan) or (B) an angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor (Perindoprilat). (n = 3). \*p < .05 versus control P3 cells. (C,D) Young (P1) and senescent (P3) endothelial cells were treated or not with either N-acetyl cysteine (NAC, an antioxidant, 1 mM), VAS-2870 (VAS, a NADPH oxidase inhibitor, 300 μM), or indomethacin (INDO, a cyclooxygenase inhibitor, 30 μM) before determination of protein expression by Western blotting. Results are presented as representative immunoblots (upper panels) and corresponding cumulative data (lower panels) for expression of the (C) ACE and (D) angiotensin II type 1 receptor (AT1R). \*p < .05 versus control P1 cells and #p < .05 versus control P3 cells (n = 3–4).



**Figure 4.** Role of the local angiotensin system and ROS formation in the premature endothelial cell senescence. (A) Young (P1) endothelial cells were treated or not with a NOS inhibitor (L-NAME, 1 mM) in the presence or absence of either losartan (Los, an AT1R antagonist, 30  $\mu$ M), perindoprilat (Perindo, an angiotensin-converting enzyme [ACE] inhibitor, 0.1  $\mu$ M), or N-acetyl cysteine (NAC, an antioxidant, 1 mM) before determination of SA- $\beta$ -gal activity by flow cytometry.  $*p < .05$  versus control P1 cells and  $\#p < .05$  versus control P3 cells ( $n = 3$ ). (B–G) Young (P1) endothelial cells were treated or not with a NOS inhibitor (L-NAME, 1 mM) in the presence or absence of either losartan (Los, an AT1R antagonist, 30  $\mu$ M), perindoprilat (Perindo, an ACE inhibitor, 0.1  $\mu$ M), or NAC (an antioxidant, 1 mM) before determination of protein expression by Western blotting. Results are presented as representative immunoblots (upper panels) and corresponding cumulative data (lower panels) for expression of (B) eNOS, (C) local angiotensin system components ACE and (D) AT1R and cell cycle regulatory proteins (E) p53, (F) p21, and (G) p16.  $*p < .05$  versus control P1 cells and  $\#p < .05$  versus control P3 cells ( $n = 3$ ).

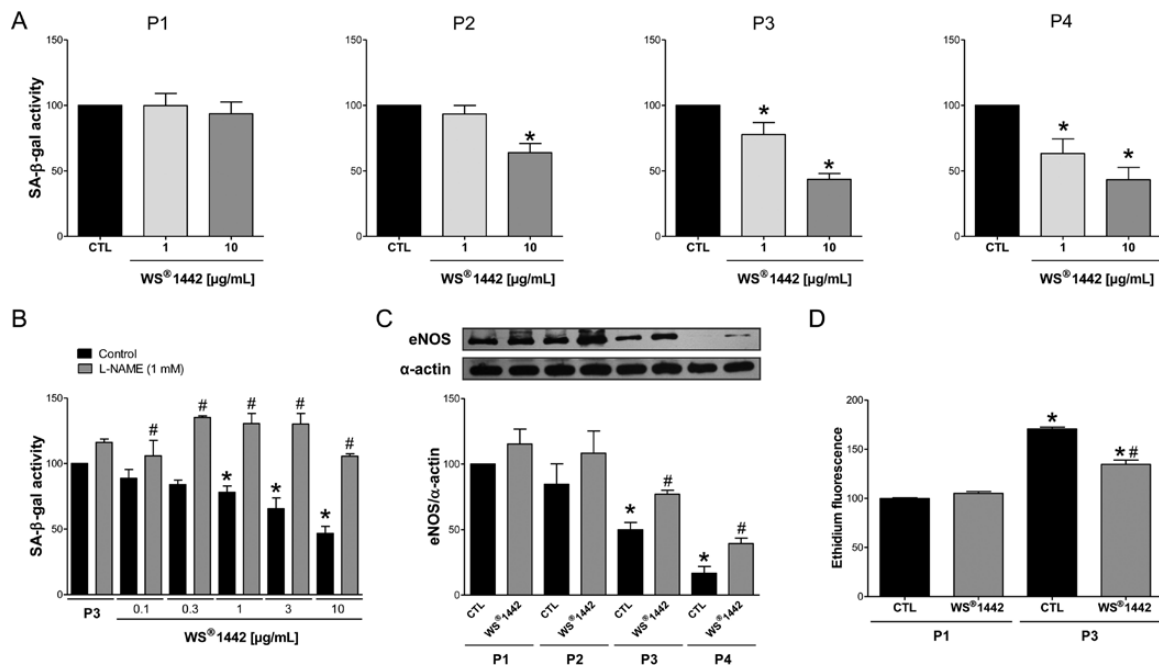
P4 (Figure 5A,B). The protective effect of the *Crataegus* treatment in cells at P3 was not observed in the presence of L-NAME (Figure 5B) indicating the key role of eNOS-derived NO. In addition, the serial passaging-induced downregulation of the eNOS protein level in cells at P3 and P4 was significantly reduced by the *Crataegus* treatment (Figure 5C). Furthermore, the *Crataegus* treatment prevented the replicative endothelial senescence-induced increase in oxidative stress in cells at P3 (Figure 5D), and this effect was associated with a reduced expression level of the cell cycle regulatory proteins p53, p21, and p16, the NADPH oxidase subunits (gp91 phox, p47 phox, and p22 phox), COX-1 and COX-2, and the local angiotensin system (Figure 6).

## Discussion

The major novel findings of the present study indicate that replicative endothelial senescence of porcine coronary artery endothelial cells is triggered by the progressive induction of a pro-oxidant state subsequent to the downregulation of the eNOS-derived NO formation associated with the upregulation of two major pro-oxidant enzymes, NADPH oxidase and COXs, and the local angiotensin system that lead to the induction of cell cycle inhibitory pathways including the p53/p21 and the p16 pathways. They also indicate

that the polyphenol-rich *Crataegus* special extract WS1442 is able to effectively delay replicative endothelial senescence by preventing the downregulation of eNOS-derived NO formation and, hence, blunting the redox-sensitive activation of the cell cycle inhibitory pathways.

Consistent with previous studies, serial passaging of primary cultured coronary artery endothelial cells is associated with the progressive induction of senescence as indicated by the increased SA- $\beta$ -gal activity and the expression of major senescence markers including p53 and its downstream target p21, a DNA damage-related cyclin-dependent kinase inhibitor (31), and p16, a member of the *Ink4* family of cyclin-dependent kinase inhibitor (32, 33; and present findings). The induction of replicative senescence is also associated with the downregulation of the eNOS pathway as indicated by a reduced eNOS mRNA and protein levels, eNOS activity, and NO formation (7, 34; and present findings). Moreover, several lines of evidence suggest that the blunted NO formation is an early key event triggering the signal transduction cascade leading ultimately to endothelial senescence (22; and present findings). Indeed, treatment of young endothelial cells with the eNOS inhibitor, L-NAME, promoted a pronounced premature induction of endothelial senescence as assessed by SA- $\beta$ -gal activity. In addition, both the NO donor DETA-NO and transfection of eNOS into human umbilical vein endothelial cells



**Figure 5.** The *Crataegus* extract (WS1442) delays replicative endothelial cell senescence: Role of eNOS-derived nitric oxide (NO) and ROS. (A) Serially passaged endothelial cells from P1 to P4 were treated with either vehicle or the *Crataegus* extract (1 and 10 μg/mL) before determination of SA-β-gal activity by flow cytometry. \**p* < .05 versus corresponding control (*n* = 3). (B) Senescent endothelial cells (P3) were treated with either vehicle or increasing concentrations of *Crataegus* extract in the absence or presence of L-NAME (NO synthase inhibitor, 1 mM) before determination of SA-β-gal activity by flow cytometry. \**p* < .05 versus untreated P3 control and #*p* < .05 versus corresponding control (*n* = 3). (C) Serially passaged endothelial cells from P1 to P4 were treated with either vehicle or the *Crataegus* extract (10 μg/mL) before determination of eNOS protein expression by Western blotting. Results are presented as representative immunoblots (upper panels) and corresponding cumulative data (lower panels). \**p* < .05 versus control P1 and #*p* < .05 versus corresponding control (*n* = 3). (D) Young (P1) and senescent (P3) endothelial cells were treated with either vehicle or the *Crataegus* extract (10 μg/mL) before determination of ROS formation by addition of the redox-sensitive fluorescent dye DHE for 30 minutes at 37 °C. Thereafter, ethidium fluorescence was determined by flow cytometry. \**p* < .05 versus control P1 cells and #*p* < .05 versus control P3 cells (*n* = 3).

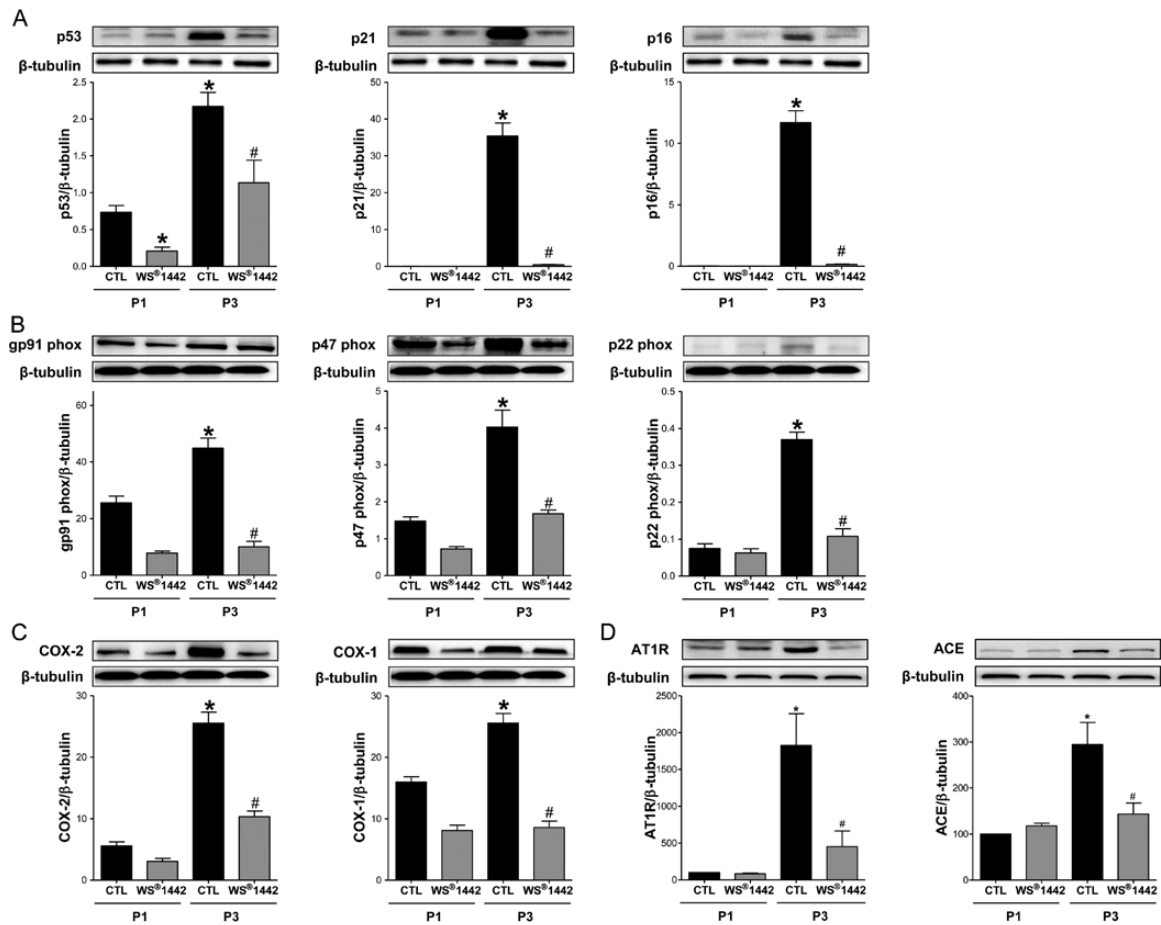
has been shown to decrease the number of senescent endothelial cells (25). NO has been suggested to delay endothelial senescence by increasing telomerase activity thereby preventing the alteration and the shortening of length of telomeres (35). Alternatively, NO may also retard the induction of senescence by preventing the downregulation of eNOS expression as the eNOS inhibitor L-NAME caused a pronounced decrease of the eNOS protein level in young cells. Moreover, NO may also contribute to retard endothelial senescence by limiting the level of oxidative stress, a potent inducer of senescence, in endothelial cells. The level of oxidative stress was significantly higher in senescent P3 cells and in L-NAME-treated premature senescent P1 young cells than in control young P1 cells, and the antioxidant NAC prevented the expression of senescence markers including p53, p21, and p16 in P3 senescent cells. The pharmacological characterization of oxidative stress in P3 senescent cells has indicated a major role of NADPH oxidase and cyclooxygenases. Additionally, both NADPH oxidase protein subunit levels, gp91 phox, p47 phox, and p22 phox, and COX-1 and COX-2 protein levels were upregulated in P3 senescent cells. Previous studies have also indicated that NADPH oxidase subunits Nox1 and Nox4 are involved in the excessive formation of ROS in senescent human endothelial cells (36). In addition, an upregulation of NADPH oxidase subunits p47 phox, Nox2, and Nox4 was observed in *JunD*<sup>-/-</sup> mice displaying premature vascular senescence associated with an impairment of the O<sub>2</sub><sup>•-</sup>/NO balance (37). Furthermore, *Nox4* gene interference using small-hairpin RNA was able to delay replicative senescence in human umbilical vein endothelial cells (38). Previous studies have also shown that COX-2 contributed to the establishment and maintenance of senescence of

human fibroblasts (39), and a low dose of aspirin delayed the onset of senescence in circulating endothelial progenitor cells (40).

The fact that increases in NADPH oxidase and COX protein levels in P3 senescent cells were prevented by NAC, apocynin, and indomethacin indicates that ROS perpetuate a sustained pro-oxidant state in senescent cells by upregulating major pro-oxidant enzymes. In addition, because NAC, apocynin, and indomethacin also prevented the downregulation of eNOS protein levels in senescent P3 cells, it implies that ROS have also a determinant role. Altogether these findings indicate that oxidative stress is a key early event triggering the downregulation of the endothelial NO formation in conjunction with the upregulation of both the NADPH oxidase- and the COX-derived formation of ROS leading ultimately to the induction of replicative senescence. Recent findings suggest a role of p53 in the mechanism underlying the downregulation of eNOS. Indeed, p53 has been shown to downregulate KLF2 expression, a positive transcriptional regulator of eNOS expression (41), either directly by transcriptional repression (11) or indirectly by upregulation of p66shc, a negative transcriptional regulator of KLF2 (42). Although the origin of the imbalance between NO and oxidative stress in replicative senescence remains unclear, it may be related to the fact that absence of shear stress, the major physiological stimulus for eNOS expression and NO formation is missing in cultured endothelial cells (43). Previous studies have indicated that shear stress prevents in part the downregulation of eNOS mRNA and protein levels in cultured human aortic endothelial cells (34).

Activation of the local angiotensin system has been shown to contribute to the increased level of oxidative stress observed in





**Figure 6.** The *Crataegus* extract (WS1442) prevents the overexpression of cell cycle regulatory proteins, NADPH oxidase subunits, cyclooxygenase isoforms, and local angiotensin system components in P3 endothelial cells. Young (P1) and senescent (P3) endothelial cells were treated with either vehicle or the *Crataegus* extract (10  $\mu$ g/mL) before determination of protein expression by Western blotting. Results are presented as representative immunoblots (upper panels) and corresponding cumulative data (lower panels) for expression of (A) cell cycle regulatory proteins p53, p21, and p16, (B) NADPH oxidase subunits gp91 phox, p47 phox, and p22 phox, (C) cyclooxygenase isoforms COX-1 and COX-2, and (D) local angiotensin system components angiotensin-converting enzyme and AT1R. \* $p < .05$  versus control P1 cells and # $p < .05$  versus control P3 cells ( $n = 3$ ).

pathological arteries such as in old arteries and in arteries from hypertensive animals and humans mostly by an AT1R-mediated activation of NADPH oxidase (44,45). Moreover, angiotensin II has been reported to be a potent inducer of premature senescence in endothelial cells (46). In the present study, endothelial senescence was associated with an upregulation of the local angiotensin system as indicated by increased expression levels of ACE and AT1 receptors in both replicative and premature senescent endothelial cells. Of interest, both responses were prevented by antioxidant treatments indicating the involvement of a redox-driven mechanism. Furthermore, the angiotensin system appears to act in a feed forward manner because it contributed to upregulate both ACE and AT1 receptors in premature senescent endothelial cells. The local angiotensin system has a determinant role in the induction of both replicative and premature endothelial senescence as indicated by the fact that both the ACE inhibitor and the AT1 receptor blocker concentration-dependently reduced SA- $\beta$ -gal activity.

The present study provides also evidence that a polyphenol-rich standardized *Crataegus* extract protects endothelial cells against replicative senescence in an eNOS-dependent manner because the protective effect of the *Crataegus* extract was abrogated by the blockade of NO formation by the eNOS inhibitor, L-NAME. The

protective effect of the *Crataegus* extract on endothelial senescence was observed at concentrations as low as 1  $\mu$ g/mL and was associated with a reduced level of oxidative stress and an improved expression level of eNOS protein in senescent endothelial cells. The beneficial effect most likely reflects the ability of the *Crataegus* extract to prevent the upregulation of the pro-oxidant enzymes including NADPH oxidase and COXs in senescent endothelial cells leading ultimately to a reduced level of oxidative stress and, hence, the maintenance of the endothelial formation of NO. These findings are consistent with previous ones indicating that the *Crataegus* extract is a potent activator of eNOS in endothelial cells (30) and that it reduced aging-related vascular oxidative stress (18). In addition, a red wine polyphenolic extract has also been shown to reduce oxidative stress-induced endothelial cell senescence (10), and resveratrol to prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescence of human umbilical vein endothelial cells (47) and the onset of endothelial progenitor cell senescence through an increase of telomerase activity (48).

Endothelial senescence has been observed in atherosclerotic-prone regions (5,7,49) that are generally exposed to disturbed blood flow, such as arterial bifurcations (50). Moreover, disturbed blood flow has been shown to promote premature senescence in endothelial cells through a p53/p21 pathway (51), to induce oxidative stress,

due at least in part to NADPH oxidase overexpression, and to reduce eNOS expression in endothelial cells, leading to a reduced NO bioavailability (50). Because NO is able to inhibit the induction of endothelial senescence (25), these findings suggest that disturbed blood flow at sites of arterial bifurcations promotes premature endothelial senescence through reduced NO bioavailability leading to activation of the p53/p21 pathway. Thus, the reduction of cellular oxidative stress and activation of the endothelial NO formation by the *Crataegus* extract seems to be an interesting approach to prevent the induction of premature senescence. The possibility that such a beneficial effect helps to maintain endothelial protection at sites of disturbed flow still remains to be investigated.

In conclusion, the present findings indicate that the redox-sensitive local angiotensin system triggers both replicative and premature endothelial senescence by causing an imbalance between the protective eNOS-derived NO pathway and the NADPH oxidase- and COX-mediated oxidative stress-dependent cycle inhibitory pathways (p53/p21, and p16). They further indicate that the *Crataegus* treatment is able to delay replicative endothelial senescence by maintaining an optimal balance between eNOS-derived NO formation and the endogenous level of oxidative stress.

## Funding

Dr N.I.-K. was supported by the Ministry of National Education, Research and Technology (France) and T.P.R. and G.C.S. by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). This work was partially supported by an unrestricted research grant from Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany.

## Acknowledgments

We are grateful to Claudine Ebel (Flow cytometry facility), Evelyne Lacoffrette, and Brigitte Pollet for their excellent technical assistance.

## References

- Herrera MD, Mingorance C, Rodríguez-Rodríguez R, Alvarez de Sotomayor M. Endothelial dysfunction and aging: an update. *Ageing Res Rev.* 2010;9:142–152. doi:10.1016/j.arr.2009.07.002
- 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–M127. doi:10.1093/gerona/50A.2.M121
- Jane-Wit D, Chun HJ. Mechanisms of dysfunction in senescent pulmonary endothelium. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2012;67:236–241. doi:10.1093/gerona/glr248
- Foreman KE, Tang J. Molecular mechanisms of replicative senescence in endothelial cells. *Exp Gerontol.* 2003;38:1251–1257. doi:10.1016/j.exger.2003.09.005
- Minamino T, Komuro I. Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis. *Circ Res.* 2007;100:15–26. doi:10.1161/01.RES.0000256837.40544.4a
- Erusalimsky JD. Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology. *J Appl Physiol (1985).* 2009;106:326–332. doi:10.1152/jappphysiol.91353.2008
- Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Ishida Y, Yoshida H, Komuro I. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation.* 2002;105:1541–1544. doi:10.1161/01.CIR.0000013836.85741.17
- Han X, Ling S, Gan W, Sun L, Duan J, Xu JW. 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-d-glucoside ameliorates vascular senescence and improves blood flow involving a mechanism of p53 deacetylation. *Atherosclerosis.* 2012;225:76–82. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.08.011
- Chen J, Brodsky SV, Goligorsky DM, et al. Glycated collagen I induces premature senescence-like phenotypic changes in endothelial cells. *Circ Res.* 2002;90:1290–1298. doi:10.1161/01.RES.0000022161.42655.98
- Botden IP, Oeseburg H, Durik M, et al. Red wine extract protects against oxidative-stress-induced endothelial senescence. *Clin Sci (Lond).* 2012;123:499–507. doi:10.1042/CS20110679
- Kumar A, Kim CS, Hoffman TA, et al. p53 impairs endothelial function by transcriptionally repressing Kruppel-Like Factor 2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:133–141. doi:10.1161/ATVBAHA.110.215061
- Dal-Ros S, Bronner C, Auger C, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenols improve an established aging-related endothelial dysfunction in the mesenteric artery of middle-aged rats: role of oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;419:381–387. doi:10.1016/j.bbrc.2012.02.031
- Idris Khodja N, Chataigneau T, Auger C, Schini-Kerth VB. Grape-derived polyphenols improve aging-related endothelial dysfunction in rat mesenteric artery: role of oxidative stress and the angiotensin system. *PLoS One.* 2012;7:e32039. doi:10.1371/journal.pone.0032039
- Bhayadia R, Schmidt BM, Melk A, Homme M. Senescence-induced oxidative stress causes endothelial dysfunction. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2015.
- Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, et al. Age-related reduction of NO availability and oxidative stress in humans. *Hypertension.* 2001;38:274–279. doi:10.1161/01.HYP.38.2.274
- Rodríguez-Manas L, El-Assar M, Vallejo S, et al. Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation. *Aging Cell.* 2009;8:226–238. doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00466.x
- Dal-Ros S, Zoll J, Lang AL, et al. Chronic intake of red wine polyphenols by young rats prevents aging-induced endothelial dysfunction and decline in physical performance: role of NADPH oxidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;404:743–749. doi:10.1016/j.bbrc.2010.12.060
- Idris-Khodja N, Auger C, Koch E, Schini-Kerth VB. *Crataegus* special extract WS(®)1442 prevents aging-related endothelial dysfunction. *Phytotherapie.* 2012;19:699–706. doi:10.1016/j.phymed.2012.04.005
- Ndiaye M, Chataigneau M, Lobysheva I, Chataigneau T, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenol-induced, endothelium-dependent NO-mediated relaxation is due to the redox-sensitive PI3-kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO-synthase in the isolated porcine coronary artery. *FASEB J.* 2005;19:455–457. doi:10.1096/fj.04-2146fj
- Alhosn M, Anselm E, Rashid S, et al. Redox-sensitive up-regulation of eNOS by purple grape juice in endothelial cells: Role of PI3-Kinase/Akt, p38 MAPK, JNK, FoxO1 and FoxO3a. *PLoS One.* 2013;8:e57883. doi:10.1371/journal.pone.0057883
- Goto K, Fujii K, Kansui Y, Iida M. Changes in endothelium-derived hyperpolarizing factor in hypertension and ageing: response to chronic treatment with renin-angiotensin system inhibitors. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004;31:650–655. doi:10.1111/j.1440-1681.2004.04054.x
- Kansui Y, Fujii K, Goto K, Abe I, Iida M. Angiotensin II receptor antagonist improves age-related endothelial dysfunction. *J Hypertens.* 2002;20:439–446.
- Wang M, Zhang J, Jiang LQ, et al. Proinflammatory profile within the grossly normal aged human aortic wall. *Hypertension.* 2007;50:219–227. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.089409
- Auger C, Kim JH, Chabert P, et al. The EGCg-induced redox-sensitive activation of endothelial nitric oxide synthase and relaxation are critically dependent on hydroxyl moieties. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;393:162–167. doi:10.1016/j.bbrc.2010.01.112
- Hayashi T, Matsui-Hirai H, Miyazaki-Akita A, et al. Endothelial cellular senescence is inhibited by nitric oxide: implications in atherosclerosis associated with menopause and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:17018–17023. doi:10.1073/pnas.0607873103
- Erusalimsky JD, Skene C. Mechanisms of endothelial senescence. *Exp Physiol.* 2009;94:299–304. doi:10.1113/expphysiol.2008.043133
- Ohara Y, Peterson TE, Sayegh HS, Subramanian RR, Wilcox JN, Harrison DG. Dietary correction of hypercholesterolemia in the rabbit normalizes

- endothelial superoxide anion production. *Circulation*. 1995;92:898–903. doi:10.1161/01.CIR.92.4.898
28. Li D, Saldeen T, Romeo F, Mehta JL. Oxidized LDL upregulates angiotensin II type 1 receptor expression in cultured human coronary artery endothelial cells: the potential role of transcription factor NF-kappaB. *Circulation*. 2000;102:1970–1976. doi:10.1161/01.CIR.102.16.1970
  29. Mu X, He K, Sun H, et al. Hydrogen peroxide induces overexpression of angiotensin-converting enzyme in human umbilical vein endothelial cells. *Free Radic Res*. 2013;47:116–122. doi:10.3109/10715762.2012.749987
  30. Anselm E, Socorro VF, Dal-Ros S, Schott C, Bronner C, Schini-Kerth VB. *Crataegus* special extract WS 1442 causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of endothelial NO synthase but not via activation of estrogen receptors. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2009;53:253–260. doi:10.1097/FJC.0b013e31819ccfc9
  31. Freedman DA, Folkman J. CDK2 translational down-regulation during endothelial senescence. *Exp Cell Res*. 2005;307:118–130. doi:10.1016/j.yexcr.2005.03.025
  32. Romagosa C, Simonetti S, Lopez-Vicente L, et al. p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene*. 2011;30:2087–2097. doi:10.1038/onc.2010.614
  33. Lee MY, Wang Y, Vanhoutte PM. Senescence of cultured porcine coronary arterial endothelial cells is associated with accelerated oxidative stress and activation of NFkB. *J Vasc Res*. 2010;47:287–298. doi:10.1159/000265563
  34. Matsushita H, Chang E, Glassford AJ, Cooke JP, Chiu CP, Tsao PS. eNOS activity is reduced in senescent human endothelial cells: Preservation by hTERT immortalization. *Circ Res*. 2001;89:793–798. doi:10.1161/hh2101.098443
  35. Vasa M, Breitschopf K, Zeiher AM, Dimmeler S. Nitric oxide activates telomerase and delays endothelial cell senescence. *Circ Res*. 2000;87:540–542. doi:10.1161/01.RES.87.7.540
  36. Schilder YD, Heiss EH, Schachner D, et al. NADPH oxidases 1 and 4 mediate cellular senescence induced by resveratrol in human endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2009;46:1598–1606. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.03.013
  37. Paneni F, Osto E, Costantino S, et al. Deletion of the activated protein-1 transcription factor JunD induces oxidative stress and accelerates age-related endothelial dysfunction. *Circulation*. 2013;127:1229–1240. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000826
  38. Lener B, Koziel R, Pircher H, et al. The NADPH oxidase Nox4 restricts the replicative lifespan of human endothelial cells. *Biochem J*. 2009;423:363–374. doi:10.1042/BJ20090666
  39. Martien S, Pluquet O, Vercamer C, et al. Cellular senescence involves an intracrine prostaglandin E2 pathway in human fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1831:1217–1227. doi:10.1042/BJ20090666
  40. Hu Z, Zhang F, Yang Z, et al. Low-dose aspirin promotes endothelial progenitor cell migration and adhesion and prevents senescence. *Cell Biol Int*. 2008;32:761–768. doi:10.1016/j.cellbi.2008.03.004
  41. Atkins GB, Jain MK. Role of Krüppel-like transcription factors in endothelial biology. *Circ Res*. 2007;100:1686–1695. doi:10.1161/01.RES.0000267856.00713.0a
  42. Kim CS, Jung SB, Naqvi A, et al. p53 impairs endothelium-dependent vasomotor function through transcriptional upregulation of p66shc. *Circ Res*. 2008;103:1441–1450. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.181644
  43. Davis ME, Cai H, Drummond GR, Harrison DG. Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways. *Circ Res*. 2001;89:1073–1080. doi:10.1161/hh2301.100806
  44. Doughan AK, Harrison DG, Dikalov SI. Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. *Circ Res*. 2008;102:488–496. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.162800
  45. Harrison DG, Cai H, Landmesser U, Griendling KK. Interactions of angiotensin II with NAD(P)H oxidase, oxidant stress and cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2003;4:51–61. doi:10.3317/jraas.2003.014
  46. Shan H, Guo D, Li X, Zhao X, Li W, Bai X. From autophagy to senescence and apoptosis in Angiotensin II-treated vascular endothelial cells. *APMIS*. 2014;122:985–992. doi:10.1111/apm.12242
  47. Kao CL, Chen LK, Chang YL, et al. Resveratrol protects human endothelium from H(2)O(2)-induced oxidative stress and senescence via SirT1 activation. *J Atheroscler Thromb*. 2010;17:970–979. doi:10.5551/jat.4333
  48. Xia L, Wang XX, Hu XS, et al. Resveratrol reduces endothelial progenitor cells senescence through augmentation of telomerase activity by Akt-dependent mechanisms. *Br J Pharmacol*. 2008;155:387–394. doi:10.1038/bjp.2008.272
  49. Vasile E, Tomita Y, Brown LF, Kocher O, Dvorak HF. Differential expression of thymosin beta-10 by early passage and senescent vascular endothelium is modulated by VPF/VEGF: evidence for senescent endothelial cells in vivo at sites of atherosclerosis. *FASEB J*. 2001;15:458–466. doi:10.1096/fj.00-0051com
  50. Chiu JJ, Chien S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev*. 2011;91:327–387. doi:10.1152/physrev.00047.2009
  51. Warboys CM, de Luca A, Amini N, et al. Disturbed flow promotes endothelial senescence via a p53-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34:985–995. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303415

## **Résultats et conclusion :**

Les résultats de cette étude indiquent que le passage en série de P1 à P4 (modèle de sénescence répllicative) ainsi que le traitement de CEs jeunes à P1 avec le L-NAME, un inhibiteur de l'eNOS, (modèle de sénescence prématurée) a favorisé l'acquisition de marqueurs de la sénescence, comme en témoigne l'augmentation de l'activité SA- $\beta$ -galactosidase et la surexpression des protéines inhibitrices du cycle cellulaire (p53, p21, p16), associée à une augmentation de la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Cet état pro-oxydant est accompagné par une diminution de l'expression de la eNOS et à la surexpression des deux principales sources enzymatiques de ROS dans la CE, à savoir la NADPH oxydase et les COXs. Une augmentation de l'expression de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) et du récepteur de l'angiotensine (AT1R) a également été observé dans les CEs sénescents. Ces effets ont été abolis par le N-acétylcystéine, un antioxydant non spécifique, le VAS-2870, inhibiteur de la NADPH oxydase, l'indométacine, inhibiteur de COX et également par le perindoprilate, un inhibiteur de l'ACE, et par le losartan, un antagoniste des récepteurs AT1R, montrant un rôle redox sensible du système angiotensine local dans l'induction de la sénescence endothéliale. Le traitement des CEs sénescents par un extrait de *Crataegus* WS1442 riche en polyphénols anti oxydants et puissant stimulateur de la production de NO, a diminué les marqueurs de la sénescence aussi bien dans le modèle de sénescence répllicative que dans le modèle de sénescence prématurée de manière concentration dépendante. L'extrait de *Crataegus* a également diminué le stress oxydant, amélioré la fonction endothéliale et prévenu l'activation du système angiotensine local. Cet effet semble être dépendant de la eNOS car le *Crataegus* n'est plus capable de protéger la CE en présence de L-NAME, inhibiteur de la eNOS. Ces résultats indiquent que la diminution de la formation de NO par la eNOS, favorise l'apparition d'un état pro-oxydant à l'origine de l'activation du système angiotensine local. Ce dernier, via l'activation des enzymes pro oxydantes va amplifier le stress oxydant afin de maintenir la dysfonction et la sénescence endothéliale.

En conclusion, cette étude montre un rôle redox sensible du système d'angiotensine local, en réponse à la diminution de NO dans la voie de signalisation menant à la sénescence endothéliale. Cette séquence d'événements a été inhibée par un extrait riche en polyphénols, principalement en augmentant la formation de NO, équilibrant ainsi le niveau endogène de stress oxydant.

## **Article 2**

**Article 2** : soumis à Cardiovascular Research.

Redox-sensitive upregulation of SGLT2 expression mediates the high glucose-induced premature endothelial cell senescence and acquisition of pro-atherothrombotic markers via the activation of the local angiotensin system. **Sonia Khemais-Benkhiat**, Noureddine Idris-Khodja, Sinhee Park, Lamia Amoura, Malak Abbas, Cyril Auger, Laurence Kessler, Eric Mayoux, Florence Toti, Valérie B. Schini-Kerth.

Le diabète est un facteur de risque cardiovasculaire majeur. La sénescence endothéliale induite par l'hyperglycémie favorise la dysfonction endothéliale qui constitue un facteur clé dans la pathogenèse des complications microvasculaires et macrovasculaires du diabétique (Versari *et al.*, 2009). Ces complications augmentent le risque de décès prématuré par maladie cardiovasculaire, principale cause de décès chez le diabétique (Nwaneri *et al.*, 2013). L'empagliflozine, un inhibiteur sélectif du co-transporteur de sodium glucose 2 (SGLT2), a réduit le risque de mortalité cardiovasculaire chez les patients diabétiques de type 2 de 38%, malgré une réduction modérée de l'HbA1c d'environ 0.6% (EMPA-REG OUTCOME, 2015). Le mécanisme de cette protection CV reste encore incompris. Des études *in vivo*, ont montré un effet bénéfique des inhibiteurs de SGLT2 dans la dysfonction endothéliale dans un modèle de diabète de type 1 (Oelze *et al.*, 2014, Salim *et al.*, 2016) et de type 2 (Steven *et al.*, 2017). Cependant, il n'est pas connu si SGLT2 contribue à l'altération de la fonction endothéliale en facilitant l'entrée du glucose, étant donné que l'ARNm SGLT2 n'a pas été détecté dans des cellules endothéliales humaines et de souris contrairement au SGLT1 (Han *et al.*, 2015).

L'objectif de cette étude est d'évaluer le rôle de SGLT2 dans la sénescence et la dysfonction endothéliale induite par le high glucose et caractériser les mécanismes sous-jacents, puis, d'examiner l'expression de SGLT2 *ex vivo* dans des sites artériels caractérisés par une sénescence endothéliale prématurée.

Le modèle de sénescence endothéliale prématurée a été développé en exposant les CEs jeunes (P1) à une concentration élevée de glucose (25 mM). L'aorte thoracique ainsi que la crosse aortique ont été prélevées de rats Wistar mâles âgés de douze semaines pour l'étude *ex vivo*

**Redox-sensitive upregulation of SGLT2 expression mediates the high glucose-induced premature endothelial cell senescence and acquisition of pro-atherothrombotic markers via the activation of the local angiotensin system**

Sonia Khemais-Benkhiat<sup>1</sup>, Noureddine Idris-Khodja<sup>1</sup>, Sinhee Park<sup>1</sup>, Lamia Amoura<sup>1</sup>, Malak Abbas<sup>1</sup>, Cyril Auger<sup>1</sup>, Laurence Kessler<sup>2</sup>, Eric Mayoux<sup>3</sup>, Florence Toti<sup>1</sup>, Valérie B. Schini-Kerth<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> UMR CNRS 7213 Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Illkirch, France.

<sup>2</sup> EA7293 Stress Vasculaire et Tissulaire en Transplantation, Faculté de Pharmacie, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Université de Strasbourg, Illkirch, France.

<sup>3</sup> Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Biberach, Germany.

**Short title:** SGLT2 and high glucose-induced endothelial senescence

**Name and complete address of corresponding author:**

Valérie B. Schini-Kerth, PhD  
UMR CNRS 7213, Faculty of Pharmacy  
74, route du Rhin  
67401 Illkirch, France  
Phone: +33 3 68 85 41 27  
Fax: +33 3 68 85 43 13  
Email: valerie.schini-kerth@unistra.fr

**Total word count: XXXX**

**Number of Figures: X**

## **Abstract**

**Aims:** High glucose (HG)-induced endothelial senescence is thought to promote endothelial dysfunction leading to an increased cardiovascular risk in diabetes. Empagliflozin (EMPA), a selective sodium glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitor, reduced the risk of cardiovascular mortality in type 2 diabetic patients but the protective mechanism still remains unclear. Although control endothelial cells (ECs) express SGLT1, SGLT2 was undetected. This study examined the possibility that HG induces the appearance of SGLT2 leading to endothelial senescence and dysfunction and, if so, to characterize the underlying mechanism.

**Methods and Results:** Exposure of porcine coronary artery ECs at passage 1 to HG for 96 h significantly increased the level of senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-Gal activity), promoted acquisition of senescence markers (p21 and p16), oxidative stress and the down-regulation of eNOS expression and NO formation with the appearance of a pro-atherothrombotic state as indicated by the increased expression of VCAM-1 and tissue factor (TF). HG upregulated also the expression of angiotensin-converting enzyme (ACE) and of AT1 receptors (AT1R). The antioxidant N-acetylcysteine, the ACE inhibitor Perindoprilat and the AT1R antagonist Losartan prevented the HG-induced ECs senescence. Similarly, EMPA concentration-dependently (1 to 100 nM) prevented HG-induced ECs senescence and oxidative stress, and normalized the expression of p16, p21, eNOS, VCAM-1, TF, ACE and ATR1, whereas it did not affect replicative ECs senescence. EMPA did not affect the basal glucose uptake in ECs but significantly reduced that stimulated by HG and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Both HG and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> caused the appearance of SGLT2 mRNA and increased the SGLT2 protein level in ECs. An increased expression level of SGLT2 and down-regulation of eNOS were also observed at arterial sites at risk (aortic cross) compared with those at low risk (thoracic aorta) in young rats.

**Conclusions:** The HG-induced premature ECs ageing characterized by the down-regulation of NO formation and the expression of pro-atherothrombotic factors is mediated by the activation of the local angiotensin system. The pro-senescence pathway is driven by the redox-sensitive upregulation of SGLT2 expression promoting excessive glucose entry and as a consequence oxidative stress. The fact that an increased SGLT2 expression level is observed *in vivo* at arterial sites at risk, suggests that inhibition of SGLT2 might be an attractive strategy to protect the cardiovascular system.

**Keywords:** Endothelial cells, senescence, SGLT2, high glucose



## 1. Introduction

Diabetes mellitus is a major public health problem currently affecting more than 387 million people worldwide and this number is estimated to increase to 592 million by 2035 (IDF Diabetes Atlas. 2014, 6<sup>th</sup> Edition). Both microvascular complications, including retinopathy, nephropathy and neuropathy, and macrovascular complications including ischemic heart diseases and cerebrovascular diseases increase the risk of premature death from cardiovascular disease, the leading cause of death, in diabetes mellitus (Nwaneri et al., 2013). Endothelial dysfunction is an early key event contributing to the initiation and development of diabetic vascular complications (Versari et al., 2009; Grover-Páez and Zavalza-Gómez, 2009). Indeed, reduced endothelium-dependent nitric oxide (NO)-mediated vasodilatation is observed in patients with type 1 and 2 diabetes (Johnstone et al., 1993; Williams et al 1996; Ting et al., 1996), and blunted NO-mediated relaxation in experimental models of diabetes (De Vriese et al., 2000; Hink et al., 2001; Shi and Vanhoutte, 2009). Since exposure of isolated arteries and cultured endothelial cells (ECs) to high glucose (HG) reduced the formation of NO (Tesfamariam et al., 1990; Bohlen and Lash, 1993; Pieper et al., 1997), ECs appear to be particularly sensitive to glucotoxicity. The mechanisms underlying the hyperglycemia-induced endothelial dysfunction have been shown to involve NADPH oxidase- and mitochondria-derived oxidative stress (Nishikawa et al., 2000; Hink et al., 2001), uncoupled endothelial NO synthase (Hink et al., 2001), advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs signaling (Schmidt et al., 1999), and increased levels of asymmetric dimethylarginine (Lin et al., 2002). More recently, endothelial senescence has been identified as a potential contributor to the premature alteration of the endothelial function in diabetes. Indeed, senescent endothelial cells were observed in the aorta of diabetic rats (Chen et al., 2002; Hayashi et al., 2006; Matsui-Hirai et al., 2011) and the exposure of endothelial cells to a high concentration of glucose increased the number of senescence associated-beta-galactosidase (SA- $\beta$ -gal) positive cells (Hayashi et al., 2006; Matsui-Hirai et al., 2011). Endothelial senescence characterized by an irreversible form of growth arrest, is accompanied by functional and structural changes and altered gene expression including increased oxidative stress and the down-regulation of the eNOS-derived formation of NO, and, as a consequence, an upregulation of pro-atherothrombotic responses (Hayashi et al., 2006; Matsui-Hirai et al., 2011).

Gliflozins are a new class of anti-diabetic drugs targeting the sodium-glucose co-transporter 2 (SGLT2), located in the S1-S2 segments of the proximal tubule in the kidney and responsible for nearly 90% of renal glucose reabsorption. In addition to SGLT2, SGLT1 in the distal

segment S3 accounts for the reabsorption of the remaining 10% (Abdul-Ghani et al., 2011). Thus, inhibition of SGLT2 leads to a significant reduction in the blood glucose level by preventing glucose reabsorption in the kidney. Empagliflozin, a selective SGLT2 inhibitor, reduced cardiovascular mortality in type 2 diabetic patients by 38%, despite a moderate reduction in HbA1c (EMPA-REG OUTCOME, 2015). In addition, Empagliflozin decreased the progression of kidney disease and lowered the rate of clinically relevant renal events (EMPA-REG OUTCOME, 2016). The role of SGLT2 in diabetes-related endothelial dysfunction and vascular complications has been poorly studied. Recently, SGLT inhibitors have been shown to attenuate the endothelial dysfunction in streptozotocin-treated mice and rats (Oelze et al., 2014; Salim et al., 2016) and in Zucker diabetic fatty rats (Steven et al., 2017). However, it is unclear whether the vasoprotective effect of SGLT inhibitors is related to the decreased renal sodium and glucose reabsorption and/or to a direct effect at the arterial wall. Indeed, SGLT1 expression has been observed in cultured ECs and in the endothelium of the mouse thoracic aorta, and its expression is increased in capillaries and small vessels after brain ischemia and reperfusion (Elfeber et al., 2004; Jin et al., 2013). In contrast to SGLT1, studies regarding the expression of SGLT2 in ECs have indicated that SGLT2 mRNA levels were undetectable in control cultured human pulmonary and coronary artery EC lines (Han et al., 2015). Since cultured ECs often undergo pronounced phenotypic changes following numerous passages, SGLT2 expression remains to be determined in primary and low passages of ECs under both physiological and pathological conditions. Therefore, the aim of the present study was to investigate the possibility that SGLT2 may play a role in endothelial senescence and dysfunction in chronic hyperglycemia raising the interest and the understanding of the use of SGLT2 inhibitors in type 2 diabetes. In addition, the role of SGLT2 has also been examined *ex vivo* at atherosusceptible arterial sites exposed to disturbed blood flow and characterized by oxidative stress, premature endothelial senescence and dysfunction in rats.

## **2. Methods**

### **2.1 Isolation and culture of coronary artery endothelial cells (ECs)**

Porcine hearts were collected from the local slaughterhouse (SOCOPA, Holtzheim, France). Left circumflex coronary arteries were excised, cleaned and flushed with PBS without calcium to remove remaining blood. To prepare primary cultures, ECs were isolated by collagenase

treatment (type I, Worthington, 1 mg/ml for 12 min at 37°C), and cultured in culture dishes containing MCDB 131 medium (Invitrogen) supplemented with fungizone (250 µg/ml), penicillin (100 UI/ml), streptomycin (100 UI/ml), L-glutamine (2 mM, all from Lonza, Levallois-Perret, France) and 15% fetal calf serum, and grown for 48–72 h (passage 0). To induce premature senescence, ECs at passage 1 were incubated with either normal glucose concentration (NG: 5 mM) or high glucose (HG: 25 mM) for 48 or 96 h. To induce replicative senescence, ECs were detached with trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (trypsin-EDTA; Life Technologies SAS) and further passaged at a ratio of 1:3 at regular intervals. For platelet aggregation experiments, ECs were cultured on Cytodex-3 beads, which were hydrated and sterilized according to the instructions supplied by the manufacturer (GE Healthcare Life Sciences). ECs at passage 1 grown on Cytodex-3 beads were incubated in the absence or presence of HG for 96 h before their addition to platelet suspensions (Zerr-Fouineau et al. 2009).

## **2.2 Determination of SA-β-gal activity by flow cytometry**

SA-β-galactosidase activity was determined by flow cytometry using the fluorogenic substrate C<sub>12</sub>FDG (5-dodecanoylamino fluorescein Di-β-D-galactopyranoside, Invitrogen, Life Technology, SAS) as described previously (Kurz, Decary et al. 2000). ECs were pretreated with 300 µM chloroquine for 1 h to induce lysosomal alkalization. C<sub>12</sub>FDG (33 µM) was then added to the incubation medium (without phenol red) for 1 h. At the end of the incubation period, ECs were washed with ice-cold PBS, resuspended following trypsinization and analyzed using a flow cytometer (FACScan, BD Bioscience, CA, USA). Data were acquired and analyzed using the Cellquest software (Becton Dickinson). Light scatter parameters were used to eliminate dead cells and subcellular debris. The C<sub>12</sub>-fluorescein signal was measured on the FL1 detector, and the proportion of ECs with SA-β-gal activity was estimated using the median fluorescence intensity of the population. Autofluorescence assessed in parallel in ECs not exposed to C<sub>12</sub>FDG was negligible.

## **2.3 Western blot analysis**

ECs were washed with PBS and then lysed in extraction buffer (composition in mM: NaCl 150, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1, sodium pyrophosphate 10, NaF 20, okadaic acid 0.01 (Sigma), Tris/HCl 20 (pH 7.5; QBiogene), a tablet of protease inhibitor (Roche) and 1% Triton X-100 (QBiogen)). Equal amounts of proteins were separated on denaturing SDS (10-12%) polyacrylamide gel. Separated proteins were transferred electrophoretically onto nitrocellulose membrane (GE

Healthcare Life Sciences). Blots were blocked at room temperature with 5% bovine serum albumin in PBS plus 0.1% Tween 20 (Sigma). For detection of proteins, membranes were incubated with the respective primary antibody: a rabbit polyclonal anti-eNOS (diluted 1:1.000; Cell Signaling Technology; cat. n° #9572), a rabbit polyclonal anti-p53 (diluted 1:1.000; Santa Cruz; cat. n° SC-6243), a mouse monoclonal anti-p21 (diluted 1:500; Santa Cruz; cat. n° SC-271532), a mouse monoclonal anti-p16 (diluted 1:500; Santa Cruz; cat. n° SC-390485), a rabbit polyclonal anti-tissue factor (TF, diluted 1:1.000; Abcam; cat. n° ab104513), a rabbit polyclonal anti-VCAM-1 (diluted 1:1.000; Abcam; cat. n° ab134047), a mouse monoclonal anti-p22<sup>phox</sup> (diluted 1:1.000; Santa Cruz; cat. n° SC-5827), a rabbit polyclonal anti-p47<sup>phox</sup> (diluted 1:1.000; Santa Cruz; cat. n° SC-14015), a mouse monoclonal anti-cyclooxygenase-1 (COX-1, diluted 1:1.000; Santa Cruz; cat. n° SC-19998), a mouse monoclonal anti-COX-2 (diluted 1:500; Santa Cruz; cat. n° SC-376861), rabbit polyclonal anti-angiotensin-converting enzyme (ACE, diluted 1:1000; Abbiotec), rabbit polyclonal anti-angiotensin type 1 receptor (AT1R, diluted 1:1000; Santa Cruz Technology), a rabbit polyclonal anti-SGLT1 (diluted 1:1.000; Santa Cruz; cat. n° SC-98974), a rabbit polyclonal anti SGLT2 (diluted 1:1.000; Santa Cruz; cat. n° SC-98975) or a mouse monoclonal anti- $\beta$ -tubulin (diluted 1:10.000; Sigma-Aldrich; cat. n° T7816) overnight at 4°C. After washing, membranes were incubated with the secondary antibody (peroxidase-labeled anti-rabbit or anti-mouse immunoglobulin G, dilution of 1:5000; Cell Signaling Technology; cat. n° #7074, #7076, respectively) at room temperature for 60 min. Prestained markers (Invitrogen) were used for molecular mass determinations. Immunocomplexes were detected by chemiluminescence reaction (ECL; Amersham, Les Ulis, France) followed by densitometric analysis using the software Image J.

## **2.4 Analysis of mRNA expression by RT-PCR**

Total RNAs were isolated from ECs or tissues using the mirVANA® Isolation kit (Invitrogen). In some experiments, mRNAs were purified from the total RNAs using a poly (dt) primer, in accordance with the manufacturer's instructions (Macherey-Nagel). A rat intestine sample was used as positive control for SGLT1, and porcine kidney sample as positive control for SGLT2. cDNA was obtained by reverse transcription of DNase-free RNA templates using QuantiTect® reverse transcription kit (Quiagen). Primer sequences included porcine SGLT1: 5'GTGGGCAGCTCTTCGATTAC 3' (sense), 5 'AACACAGGCGGTAGAGATGC 3' (antisense); porcine SGLT2: 5 'TGAGTGGAATGCTCTGTTCG 3' (sense), 5'ACGAAGGTCTGCACCGTATC 3 '(antisense); Porcine GAPDH: 5 'ACCACAGTCCATGCCATCAC 3' (sense), 5 'TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'

(antisense), and rat 40S ribosomal protein S16 5'TCTGGGCAAGGAGAGATTTG 3' (sense), 5' CCGCCAAACTTCTTGGATTC 3' were used as housekeeping gene. qPCR were made in duplicate with a Bio-Rad Real Time PCR System. Results were normalized with GAPDH and expressed as fold change over control.

## **2.5 Determination of NO formation by electron paramagnetic resonance**

NO formation was assessed in ECs cultured on Cytodex-3 beads by electron paramagnetic resonance after formation of [Fe(II)NO(DETC)<sub>2</sub>], a paramagnetic diethyldithiocarbamate iron complex with NO, at 77 K in a Dewar flask using a MS100 spectrometer (Magnettech Ltd., Berlin, Germany). The ESR methodology was used as reported previously (Kleschyov and Munzel 2002). The values are expressed in signal amplitude (arbitrary units).

## **2.6 Determination of platelet aggregation**

Washed human platelet suspensions kindly provided by the Etablissement Français du Sang – Alsace (Strasbourg), were prepared as previously described (Zerr-Fouineau, Jourdain et al. 2009). Suspensions of washed platelets (450 µl, 3.10<sup>8</sup> platelets/ml) were incubated for 2 min in a Chronolog 490 aggregometer (Stago BNL) with continuous stirring at 1000 rpm before addition of a submaximal concentration of U46619 (0.07 µM, a thromboxane A<sub>2</sub> analog) and fibrinogen (1.6 mg/ml). A volume of 10 to 20 µl of beads covered with ECs was added to platelet suspensions 2 min before the addition of U46619.

## **2.7 Determination of oxidative stress**

ECs were seeded into Lab-Tek® chamber slide for 24 h, then exposed to serum-free MCDB 131 (Invitrogen) for 6 h. The redox-sensitive fluorescent dye dihydroethidium (DHE) was used to evaluate the formation of reactive oxygen species (ROS). ECs were incubated with DHE (5 µM) for 30 min at 37°C in a light protected manner. ECs were then washed and mounted in DAKO medium (fluorescence editing medium, DAKO) and examined under confocal microscope (Leica SP2 UV DM Irbe). Images were analyzed using Image J software.

## **2.8 Determination of glucose uptake analysis by flow cytometry**

ECs were seeded at a density of 2x10<sup>5</sup> cells per well in a 6 well plate and incubated overnight. Then, ECs were incubated in serum-free media for 6 h before being washed once with PBS and incubated with 100 µM of 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose (2-NBDG, Life Technologies) for 1 h at 37°C in either Na<sup>+</sup> containing buffer: (composition in

mM: NaCl 140 , KCl 5 , CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgSO<sub>4</sub> 1, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1, and HEPES 10 (pH 7.4); or Na<sup>+</sup>-free buffer with NaCl replaced by choline chloride. Thereafter, ECs were trypsinized before being centrifuged at 300 g for 5 min at room temperature and washed once with PBS. Cell pellets were resuspended in 300 µl PBS and the 2-NBDG fluorescence was determined in the FITC channel (FL-1) using a flow cytometer (FACScan). Mean fluorescence intensity of 2-NBDG was used to measure glucose uptake by ECs. Unstained control was used to optimize FACS settings.

## **2.9 Ex vivo experiment**

Male twelve-week old Wistar rats were euthanized with sodium pentobarbital (100 mg/kg, i.p., Centravet, Velaine-en-Haye, France). The cross and thoracic aorta were carefully removed and cleaned of connective tissue, cut into segments (5 mm in length), frozen and liquid nitrogen and stored at -80 °C until use.

## **2.10 Statistical Analyses**

Data are presented as mean ± SEM of n different experiments. Mean values were compared using Student's paired t test or an analysis of variance followed by the post-hoc Bonferroni test to identify significant differences between treatments using GraphPad Prism (v5.0). The difference was considered to be significant when the *P* value was less than .05.

# **3. Results**

## **3.1 High glucose-induced endothelial senescence is prevented by Empagliflozin**

The role of SGLT2 in HG-induced endothelial senescence, an early event promoting endothelial dysfunction (Kumar et al., 2011), is examined using the selective SGLT2 inhibitor Empagliflozin in cultured porcine coronary artery endothelial cells (ECs) and assessed by the SA-β-gal activity using C<sub>12</sub>FDG. Treatment of ECs with Empagliflozin inhibited the HG-induced ECs senescence in a concentration-dependent manner with a significant effect observed at concentrations within the range of 1-100 nM (Figure 1A). In contrast, Empagliflozin did not affect the low level of senescence in ECs at P1 and replicative senescence assessed in ECs at P3 (Figure 1B). Since oxidative stress has been involved in HG-induced ECs senescence (Matsui-Hirai et al., 2011), experiments have determined the possibility that Empagliflozin affects oxidative stress-induced ECs senescence using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced increased SA-

$\beta$ -gal activity was markedly prevented by the antioxidant N-acetyl-cysteine but not by Empagliflozin (Figure 1C) indicating that the SGLT2 inhibitor does not affect the signal transduction pathway leading to senescence in response to oxidative stress. Consistent with an increased SA- $\beta$ -gal activity, HG upregulated the expression level of the senescence markers p21 and p16 but not p53, and this effect was prevented by Empagliflozin (Figure 1D). Empagliflozin alone did not affect the low basal expression level of p53, p21 and p16 (Figure 1D).

### **3.2 High glucose-induced endothelial dysfunction is prevented by Empagliflozin**

Since HG is known to promote an impaired eNOS-derived NO formation and the expression of pro-atherothrombotic responses in ECs (Hayashi et al., 2006; Matsui-Hirai et al., 2011), experiments have evaluated whether Empagliflozin is able to prevent these noxious effects of HG. HG caused the down-regulation of the expression level of eNOS protein (Figure 2A), and a reduced formation of NO to bradykinin as evaluated by electron paramagnetic resonance in ECs at P1 (Figure 2B), Empagliflozin prevented both of these effects. Since NO is a potent inhibitor of platelet aggregation (Zerr-Fouineau et al., 2009), the ability of ECs to inhibit platelet aggregation to U46619, a thromboxane A<sub>2</sub> analog, was evaluated by adding ECs pre-treated with either normal glucose or high glucose. As expected, the addition of increasing numbers of ECs at P1 incubated in normal glucose to suspensions of washed human platelets very effectively inhibited platelet aggregation to U46619 (Figure 2C). Since treatment of ECs with the NO synthase inhibitor N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine (300  $\mu$ M) prevented the anti-aggregatory effect of platelets, it can be attributed to eNOS-derived NO (Abbas et al., 2017). In contrast, HG-treated ECs had a reduced ability to inhibit platelet aggregation whereas Empagliflozin partially but significantly restored the anti-aggregatory effect of the HG-treated ECs (Figure 2C). The Empagliflozin treatment alone did not affect the anti-aggregatory effect of ECs (Figure 2C). In addition, HG increased the protein expression level of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) and tissue factor, both of these effects were abolished by Empagliflozin (Figure 2A).

### **3.3 Empagliflozin prevents glucotoxicity in ECs**

Since oxidative stress plays a key role in HG-induced induction of endothelial senescence and dysfunction (Matsui-Hirai et al., 2011), the possibility that Empagliflozin affects the oxidative stress-mediated signaling was evaluated. HG markedly increased the level of oxidative stress in ECs at P1 after 24 h, such an effect was markedly reduced by Empagliflozin (Figure 3A).

Next, pharmacological tools were used to determine the role and characterize the enzymatic sources of ROS in HG-induced endothelial senescence. Pretreatment of ECs with either the anti-oxidant NAC, the inhibitor of NADPH oxidase (VAS-2870), or the inhibitor of COXs (indomethacin) significantly reduced the HG-induced SA- $\beta$ -gal activity (Figure 3B), suggesting the involvement of both NADPH oxidase and COXs in the redox-sensitive induction of endothelial senescence. Moreover, HG induced the up-regulation of the expression of the NADPH oxidase subunits p22<sup>phox</sup> and p47<sup>phox</sup>, and also of COX-2 but not COX-1, all of these effects were prevented by Empagliflozin (Figure 3C).

### **3.4 Role of the local angiotensin system in the HG-induced ECs senescence**

Since previous studies have indicated that both AT1 receptor antagonists and inhibitors of angiotensin-converting enzyme improve the endothelial function in type 2 diabetic patients and in experimental models of diabetes (O-Driscoll et al., 1999; Cheetham et al., 2000; Wong et al., 2010) and that Ang II is a strong inducer of endothelial senescence (Shan et al., 2008), experiments have determined the role of the local angiotensin system in HG-induced endothelial senescence and its modulation by Empagliflozin. Both the ACE inhibitor Perindoprilat and the AT1R antagonist Losartan prevented the HG-induced increase in SA- $\beta$ -gal activity in ECs (Figure 4A). In addition, HG-induced endothelial senescence was associated with an increased protein expression level of both ACE and AT1 receptors, both of these effects were abolished by Empagliflozin (Figure 4B). Empagliflozin alone affected neither the expression level of ACE nor that of AT1R in ECs (Figure 4 B).

### **3.5 Glucotoxicity promotes SGLT-1 and 2-mediated glucose uptake and expression of SGLT1 and 2 in ECs**

Since previous studies have indicated that native and cultured ECs express SGLT1 whereas SGLT2 was not detectable (Jin et al., 2013; Han et al., 2015), experiments have determined the contribution of both SGLTs to glucose uptake into ECs under basal conditions and following exposure to HG using the fluorescent probe 2-NBD-glucose. Under basal conditions, glucose entry into control ECs was not affected by Empagliflozin but significantly reduced by LX-4211, the dual SGLT1/2 inhibitor, by about 18.0 %, thereby implying solely a role for SGLT1 (Figures 5A and B). In contrast, following exposure of ECs to either H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or HG, an increased glucose uptake was observed, which was inhibited by both LX-4211 and Empagliflozin suggesting that under glucotoxicity conditions both SGLT1 and 2 contribute to glucose uptake (Figures 5 A and B). Further evidence for the glucotoxicity-induced ECs expression of SGLT1 and SGLT2



was assessed using RT-PCR and Western blot analyses. Although H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and HG did not significantly affect SGLT1 mRNA levels observed after 1-h and 4-h treatments, respectively, both treatments significantly increased the SGLT1 protein level by about 1.6 and 2.2-fold, respectively detected after 48 h and 96 h (Figure 6). SGLT2 mRNA levels were below the detection level in control ECs even after purification of mRNA (Figures 6 A and C) whereas a 72 kDa protein was detected by SGLT2 labeling after 48 h and 96 h by Western blot analysis (Figures 6 B and D). Exposure of ECs to either H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or HG resulted in the appearance of SGLT2 mRNA levels as assessed following mRNA purification after 1-h and 4-h treatments, respectively, and these effects were associated by a significantly increased SGLT2 protein level by about 1.6 and 1.9-fold (Figures 6 B and D).

### **3.6 Increased SGLT1 and 2 expression *in vivo* at arterial sites at risk**

Since oxidative stress stimulated the expression of SGLT1 and SGLT2 in cultured ECs, experiments were performed to determine the *in vivo* relevance of these findings by evaluating the expression level of both transporters at arterial sites at risk such as the aortic cross. Indeed, such atheroprone sites are characterized by disturbed flow, oxidative stress, premature senescence, reduced formation of NO and an increased expression of pro-atherothrombotic markers (Ding et al., 2015; Kunieda et al., 2006; Warboys et al., 2014). As expected, a reduced expression level of eNOS associated to an increased level of VCAM-1 was observed in the aortic cross as compared with the thoracic aorta subjected to laminar flow (Figure 7). Moreover, the expression level of both SGLT1 and SGLT2 was significantly higher in the aortic cross compared to the thoracic aorta, indicating an upregulation of both transporters at arterial atheroprone sites (Figure 7).

## **4. Discussion**

The major findings of the present study indicate that the selective SGLT2 inhibitor Empagliflozin very effectively prevented the HG-induced premature endothelial senescence and dysfunction as characterized by the down-regulation of the eNOS-derived NO formation, the expression of proatherosclerotic molecules including tissue factor and VCAM-1, and a reduced anti-platelet aggregatory activity. The protective effect of Empagliflozin involves its ability to prevent the HG-induced NADPH oxidase- and COXs-mediated oxidative stress triggering the subsequent activation of the pro-senescent local angiotensin system and is

explained, at least in part, by the upregulation of SGLT2 promoting excessive glucose entry in ECs. Moreover, an increased expression of SGLT2 is observed *in vivo* in young normoglycemic rats at arterial sites at risk such as the aortic arch branching, characterized by premature EC senescence and dysfunction. Altogether, these observations indicate that SGLT2 appears to be a novel target to protect the vascular system in diabetes and possibly also to retard ageing-related endothelial dysfunction.

The recent EMPA-REG OUTCOME trial has indicated that the Empagliflozin reduced the risk of major adverse cardiovascular events in type 2 diabetic patients with established cardiovascular disease with a remarkable 38% relative risk reduction of death from cardiovascular causes and 35% relative risk reduction of hospitalization for heart failure (Wanner et al., 2016). Although the mechanisms behind the cardiovascular protective benefits of Empagliflozin still remain unclear, several potential protective mechanisms have been involved such as decreases in arterial stiffness and systolic blood pressure, natriuresis and diuresis and reduced albuminuria, changes in the lipid profile with reduced triglycerides level, reduced sympathetic nervous system activity, improved myocardial energetics by augmenting ketone body oxidation, and small reductions of hyperglycemia, body weight and visceral adiposity (Inzucchi et al., 2015; Bajaj et al., 2017). In addition, experimental studies have revealed that Empagliflozin improves endothelial dysfunction in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats and in Zucker diabetic fatty rats (type 2 diabetes experimental model, Oelze et al., 2014; Steven et al., 2017), and ipragliflozin in streptozotocin-induced type 1 diabetic mouse (Salim et al., 2016). However, it remains to be clarified whether the protective effect of SGLT2 inhibition on the endothelial function in diabetes is a consequence of the improved cardiorenal function and metabolic parameters including hyperglycemia, and/or also a reduced endothelial glucotoxicity. Indeed, premature endothelial senescence as indicated by an increased SA- $\beta$ -gal positive staining is observed in the aorta of diabetic rats in particular at sites of disturbed blood flow such as bifurcations and branches (Chen et al., 2007; Matsui-Hirai et al., 2011). Since the expression of the senescence marker p53 in the endothelium promotes blunted endothelium-dependent relaxations in rat aortic rings (Kumar et al., 2011), the induction of endothelial senescence appears to be an early key events triggering endothelial dysfunction. These previous observations in conjunction with the fact that HG is a potent stimulator of premature endothelial senescence in cultured ECs (Hayashi et al., 2006; Matsui-Hirai et al., 2011; present findings), prompted investigations to clarify the role of SGLT2 in endothelial glucotoxicity.

The present findings indicate that HG-induced premature endothelial senescence in young ECs at passage 1 was concentration-dependently prevented by Empagliflozin as indicated by reduced SA- $\beta$ -gal activity and reduced activation of the p53/p21 and p16/retinoblastoma protein pathways known to inhibit cell cycle (Erusalimsky, 1985). The characterization of the mechanism underlying the HG-induced senescence has indicated a determinant role of oxidative stress generated, in part, via the activation of NADPH oxidase and cyclooxygenases, which is sustained by the up-regulation of the NADPH oxidase subunits p22<sup>phox</sup> and p47<sup>phox</sup> and COX-2 but not COX-1. Moreover, since both the ACE inhibitor Perindoprilat and the AT1R antagonist Losartan abolished the HG-induced ECs senescence, it implies a pivotal role of the local angiotensin system in the stimulatory effect of HG leading ultimately to endothelial senescence. Furthermore, the up-regulation of both ACE and AT1R observed in HG-treated ECs suggests that the local angiotensin system acts in a feed forward mechanism to sustain HG-induced endothelial senescence. HG-induced oxidative stress most likely triggers the activation of the local angiotensin system since oxidative stress has been shown to upregulate the expression of both ACE and AT1R in endothelial cells and vascular smooth muscle cells (Li et al., 2000; Mu et al., 2013). Since SGLT2 inhibition affected neither the redox-sensitive NADPH oxidase-, COX-1- and COX-2-mediated replicative ECs senescence (Khemais-Benkhiat et al., 2016; Silva et al., 2017), nor that induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, one can rule out that Empagliflozin acts as an antioxidant. Thus, the protective effect of SGLT2 inhibition is best explained by its ability to prevent the activation of the local angiotensin system subsequent to the effective inhibition of the HG-induced oxidative stress.

Consistent with previous studies (Hayashi et al., 2006; Matsui-Hirai et al., 2011), HG-induced endothelial senescence promoted pronounced endothelial dysfunction as indicated by the down-regulation of the eNOS protein level, the reduced bradykinin-stimulated NO formation, the reduced NO-mediated platelet anti-aggregatory capability of ECs, and the upregulation of pro-atherothrombotic markers including the cell adhesion molecule, VCAM-1, and the physiological activator the coagulation cascade, tissue factor. SGLT2 inhibition very efficiently prevented all components of the HG-induced endothelial dysfunction, indicating a great potential to protect the endothelium and, hence, the vascular system in diabetes. SGLT2 inhibition also been shown to normalize the expression of eNOS, components of oxidative stress including Nox1 and Nox2, receptors of advanced glycated end products, heme oxygenase-1 and inflammatory markers in the arterial wall of diabetic rats (Oelze et al., 2014; Salim et al., 2016; Stevens et al., 2017).

Since glucose entry into EC triggers oxidative stress leading to the induction of EC senescence (Aaronson, 2008), the contribution of SGLT2 to glucose entry has been determined using the fluorescent glucose tracer, 2-NBD-glucose. Although the dual SGLT1/2 inhibitor LX-4211 significantly reduced glucose entry into young EC at passage 1, no such effect was observed in response to SGLT2 inhibition indicating a major contribution of SGLT1 in healthy ECs. These findings are consistent with observations indicating that SGLT1 mRNA and protein are observed in cultured ECs and native endothelium (Jin et al., 2013; Han et al., 2015; present findings). Of interest, both the dual SGLT1/2 inhibition as well as the SGLT2 inhibition markedly reduced the pro-senescent stimulators (HG and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-enhanced glucose entry into ECs suggesting that SGLT2 contributes to glucose entry into pathological ECs. In good agreement with such a concept are the findings that SGLT2 mRNA level was undetectable in control ECs whereas a consistent SGLT2 mRNA level was observed in ECs in response to the pro-senescent stimulators (HG and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Despite undetectable levels of SGLT2 mRNA, a 72 kDa detected by SGLT2 labeling was observed in control ECs, and this signal was significantly higher in pathological ECs further supporting the concept that SGLT2 overexpression contributes to the exaggerated glucose entry into ECs under both hyperglycemic conditions and also oxidative stress conditions.

In order to obtain further *in vivo* relevance for a potential role of SGLT2 in pathological arteries, the expression level of SGLT2 protein was assessed in the aortic arch branching, which is characterized by disturbed flow, premature endothelial senescence and dysfunction in comparison with that of the thoracic aorta exposed to laminar flow triggering the vasoprotective endothelial formation of NO, in young rats (Warboys et al., 2014; Ding et al., 2015). Similar to the findings observed in healthy C57BL/6 mice (Ding et al., 2015), an endothelial dysfunction is observed in the rat aortic cross as indicated by a reduced eNOS and an increased VCAM-1 protein levels in comparison with the vasoprotected thoracic aorta. Interestingly, the endothelial dysfunction in the aortic cross was associated with a significant 2-4-fold upregulation of both SGLT2 and SGLT1 protein levels. Although additional investigations are required to determine the function of SGLT2 and SGLT1, they suggest that both sodium-glucose co-transporters contribute to the premature alteration of arterial sites at risk in non-diabetic animals.

In conclusion, the major novel findings of the present study indicate that SGLT2 is expressed in ECs under pathological conditions including hyperglycemia and oxidative stress. They further indicate that SGLT2 contributes to excessive glucose entry promoting endothelial senescence and dysfunction, in part, via the local angiotensin system acting in a feed forward

mechanism to sustain oxidative stress. Since SGLT2 expression is upregulated by oxidative stress in ECs and *in vivo* at arterial sites at risk characterized by excessive oxidative stress, SGLT2 appears to be a novel interesting target to prevent the induction of endothelial dysfunction and, hence, to retard premature vascular ageing in patients with cardiovascular risk factors characterized by excessive vascular oxidative stress.

### **Acknowledgements**

We thank Romain Vauchelles and Sophie Martin (UMR CNRS 7213, Faculty of pharmacy, Strasbourg University) for technical assistance in microscopy and image analysis, and RT-PCR analysis, respectively, and Claudine Ebel (Flow cytometry core facility, IGBMC, Strasbourg).

### **Funding**

The project is supported by an unrestricted research grant from Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Biberach, Germany.

## References

- Abbas M**, Jesel L, Auger C, Amoura L, Messas N, Manin G, Rumig C, León-González AJ, Ribeiro TP, Silva GC, Abou-Merhi R, Hamade E, Hecker M, Georg Y, Chakfe N, Ohlmann P, Schini-Kerth VB, Toti F, Morel O. Endothelial Microparticles From Acute Coronary Syndrome Patients Induce Premature Coronary Artery Endothelial Cell Aging and Thrombogenicity: Role of the Ang II/AT1 Receptor/NADPH Oxidase-Mediated Activation of MAPKs and PI3-Kinase Pathways. *Circulation*. 2017 Jan 17;135(3):280-296.
- Aronson D**. Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications. *Adv Cardiol*. 2008;45:1-16.
- Abdul-Ghani M**, Norton L, DeFronzo R (2011) Role of sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT 2) inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews* 32(4):515–531
- Bajaj HS**, Zinman B, Verma S. Antihyperglycemic agents and cardiovascular outcomes: recent insights. *Curr Opin Cardiol*. 2017 Sep;32(5):642-650.
- Bohlen HG**, Lash JM. Topical hyperglycemia rapidly suppresses EDRF-mediated vasodilation of normal rat arterioles. *Am J Physiol*. 1993 Jul;265(1 Pt 2):H219-25
- Cheetham C**, Collis J, O'Driscoll G, Stanton K, Taylor R, Green D. Losartan, an angiotensin type 1 receptor antagonist, improves endothelial function in non-insulin-dependent diabetes. *J Am Coll Cardiol*. 2000 Nov 1;36(5):1461-6.
- Chen Jun**, Hyeong-Cheon Park, Susann Patschan, Sergey V Brodsky, Olga Gealikman, Mei-Chuan Kuo, Houwei Li, Francesco Addabbo, Fung Zhang, Alberto Nasjletti, Steven S. Gross, and Michael S Goligorsky. Premature vascular senescence in metabolic syndrome: could it be prevented and reversed by a selenorganic antioxidant and peroxynitrite scavenger Ebselen? *Drug Discov Today Ther Strateg*. 2007; 4(1): 93–99.
- De Vriese AS**, Van de Voorde J, Blom HJ, Vanhoutte PM, Verbeke M, Lameire NH. The impaired renal vasodilator response attributed to endothelium-derived hyperpolarizing factor in streptozotocin--induced diabetic rats is restored by 5-methyltetrahydrofolate. *Diabetologia*. 2000 Sep;43(9):1116-25.
- Ding M**, Lei J, Han H, Li W, Qu Y, Fu E, Fu F, Wang X. SIRT1 protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via activating eNOS in diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol*. 2015 Oct 21;14:143.
- Elfeber K**, Köhler A, Lutzenburg M, Osswald C, Galla HJ et al. (2004) Localization of the Na<sup>+</sup>-D-glucose cotransporter SGLT1 in the blood-brain barrier. *Histochem Cell Biol* 121(3):201-7. doi : 10.1007/s00418-004-0633-9
- Grover-Paez, F.** and A. B. Zavalza-Gomez (2009). "Endothelial dysfunction and cardiovascular risk factors." *Diabetes Res Clin Pract* 84(1): 1-10.

**Han Y**, Cho YE, Ayon R, Guo R, Youssef KD, Pan M, Dai A, Yuan JX, Makino A. SGLT inhibitors attenuate NO-dependent vascular relaxation in the pulmonary artery but not in the coronary artery. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015 Nov 1;309(9):L1027-36

**Hayashi T**, Matsui-Hirai H, Miyazaki-Akita A, Fukatsu A. Endothelial cellular senescence is inhibited by nitric oxide: implications in atherosclerosis associated with menopause and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Nov 7; 103(45):17018-23

**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 Feb 2;88(2):E14-22.

**I. D. F. Diabetes Atlas Group** (2015). "Update of mortality attributable to diabetes for the IDF Diabetes Atlas: Estimates for the year 2013." *Diabetes Res Clin Pract* 109(3): 461-465.

**Inzucchi SE**, Zinman B, Wanner C, Ferrari R, Fitchett D, Hantel S, Espadero RM, Woerle HJ, Broedl UC, Johansen OE SGLT-2 inhibitors and cardiovascular risk: proposed pathways and review of ongoing outcome trials. *Diab Vasc Dis Res*. 2015 Mar;12(2):90-100

**Jin X**, Yi L, Chen ML, Chen CY, Chang H, Zhang T, Wang L, Zhu JD, Zhang QY, Mi MT. Delphinidin-3-glucoside protects against oxidized low-density lipoprotein-induced mitochondrial dysfunction in vascular endothelial cells via the sodium-dependent glucose transporter SGLT1. *PLoS One*. 2013 Jul 18;8(7):e68617

**Johnstone M.T.**, Creager S.J., Scales K.M., Cusco J.A., Lee B.K., Creager M.A. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation*. 1993; 88:2510–2516.

**Kleschyov AL**, Münzel T. Advanced spin trapping of vascular nitric oxide using colloid iron diethyldithiocarbamate. *Methods Enzymol*. 2002; 359:42-51

**Kumar A**, Kim CS, Hoffman TA, Naqvi A, Dericco J, Jung SB, Lin Z, Jain MK, Irani K. p53 impairs endothelial function by transcriptionally repressing Kruppel-Like Factor 2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 Jan;31(1):133-41. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.215061. Epub 2010 Oct 14.

**Kunieda T**, Minamino T, Nishi J, Tateno K, Oyama T, Katsuno T, Miyauchi H, Orimo M, Okada S, Takamura M, Nagai T, Kaneko S, Komuro I. Angiotensin II induces premature senescence of vascular smooth muscle cells and accelerates the development of atherosclerosis via a p21-dependent pathway. *Circulation* 114 (9), 953–960.

**Kurz DJ**, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*. 2000 Oct;113 ( Pt 20):3613-22.

**Li D Saldeen T Romeo F Mehta JL**. Oxidized LDL upregulates angiotensin II type 1 receptor expression in cultured human coronary artery endothelial cells: the potential role of transcription factor NF-kappaB. *Circulation*. 2000; 102:1970–1976.

**Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Tsuji H, Reaven GM, Cooke JP.** Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation*. 2002 Aug 20;106(8):987-92.

**Mu X He K Sun H et al** Hydrogen peroxide induces overexpression of angiotensin-converting enzyme in human umbilical vein endothelial cells. *Free Radic Res* . 2013;47:116–122.

**Matsui-Hirai H, Hayashi T, Yamamoto S, Ina K, Maeda M, Kotani H, Iguchi A, Ignarro LJ, Hattori Y.** Dose-dependent modulatory effects of insulin on glucose-induced endothelial senescence in vitro and in vivo: a relationship between telomeres and nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011 Jun;337(3):591-9.

**Nishikawa T., Edelstein D., Du X. L., Yamagishi S., Matsumura T., Kaneda Y., et al. (2000).** Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404, 787–790 10.1038/35008121

**Nwaneri, C., D. Bowen-Jones, et al. (2013).** "Screening for type 2 diabetes and population mortality over 10 years." *Lancet* 381(9870): 901-902.

**O'Driscoll G, Green D, Maiorana A, Stanton K, Colreavy F, Taylor R.** Improvement in endothelial function by angiotensin-converting enzyme inhibition in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol*. 1999 May;33(6):1506-11.

**Oelze M, Kröller-Schön S, Welschof P, Jansen T, Hausding M et al (2014)** The sodium glucose co-transporter 2 inhibitor empagliflozin improves diabetes-induced vascular dysfunction in the streptozotocin diabetes rat model by interfering with oxidative stress and glucotoxicity. *Plos One* 9(11):13

**PIEPER G.M., LANGENSTROER P., SIEBENEICH W.** Diabetic-induced endothelial dysfunction in rat aorta: role of hydroxyl radicals. *Cardiovasc. Res*. 1997;34:145–156.

**Salim H M , Daiju Fukuda, Shusuke Yagi, Takeshi Soeki, Michio Shimabukuro, Masataka Sata** Glycemic Control with Ipragliflozin, a Novel Selective SGLT2 Inhibitor, Ameliorated Endothelial Dysfunction in Streptozotocin-Induced Diabetic Mouse *Front Cardiovasc Med*. 2016; 3: 43.

**Schmidt AM, Yan SD, 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 Mar 19;84(5):489-97. Review.

**Shan H, Bai X, Chen X** Angiotensin II induces endothelial cell senescence via the activation of mitogen-activated protein kinases. *Cell Biochem Funct*. 2008 Jun;26(4):459-66

**Shi Y, Vanhoutte PM.** *J Diabetes*. 2009 Reactive oxygen-derived free radicals are key to the endothelial dysfunction of diabetes. *Sep*;1(3):151-62.

**Steven S, Oelze M, Hanf A, Kröller-Schön S, Kashani F, Roohani S, Welschof P, Kopp M, Gödtel-Armbrust U, Xia N, Li H, Schulz E, Lackner KJ, Wojnowski L, Bottari SP, Wenzel P, Mayoux E, Münzel T, Daiber A.** The SGLT2 inhibitor empagliflozin improves the primary diabetic complications in ZDF rats. *Redox Biol*. 2017 Oct;13:370-385.



**Tesfamariam** B, Brown ML, Deykin D, Cohen RA. Elevated glucose promotes generation of endothelium-derived vasoconstrictor prostanoids in rabbit aorta. *J Clin Invest.* 1990 Mar;85(3):929-32.

**Ting** H.H., Timimi F.K., Boles K.S., Creager S.J., Ganz P., Creager M.A. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 1996;97:22–28.

**Versari**, D., E. Daghini, et al. (2009). "Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease." *Diabetes Care* 32 Suppl 2: S314-321.

**Wanner** C, Inzucchi SE, Lachin JM, Fitchett D, von Eynatten M, Mattheus M, Johansen OE, Woerle HJ, Broedl UC, Zinman B; EMPA-REG OUTCOME Investigators Empagliflozin and Progression of Kidney Disease in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2016 Jul 28;375(4):323-34.

**Warboys** CM, de Luca A, Amini N, Luong L, Duckles H, Hsiao S, White A, Biswas S, Khamis R, Chong CK, Cheung WM, Sherwin SJ, Bennett MR, Gil J, Mason JC, Haskard DO, Evans PC Disturbed flow promotes endothelial senescence via a p53-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 May;34(5):985-95.

**Williams** S.B., Cusco J.A., Roddy M., Johnstone M.T., Creager M.A. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1996;27:567–574

**Zerr-Fouineau** M, Jourdain M, Boesch C, Hecker M, Bronner C, Schini-Kerth VB. Certain progestins prevent the enhancing effect of 17beta-estradiol on NO-mediated inhibition of platelet aggregation by endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Apr;29(4):586-93

**Zerr-Fouineau** M, Jourdain M, Boesch C, Hecker M, Bronner C, Schini-Kerth VB. Certain progestins prevent the enhancing effect of 17beta-estradiol on NO-mediated inhibition of platelet aggregation by endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Apr;29(4):586-93.



## Figure legends

**Figure 1** The selective SGLT2 inhibitor Empagliflozin prevents the high glucose-induced ECs senescence but not replicative senescence and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescence. A) ECs at P1 are exposed either normal (5 mM, NG) and high glucose (25 mM, HG) in the absence or presence of increasing concentrations of Empagliflozin for 96 h. B) ECs at P1 or P3 are exposed to increasing concentrations of Empagliflozin for 48 h. C) ECs at P1 are exposed to NAC (1 mM) or Empagliflozin (EMPA, 100 nM) for 30 min before being exposed to 100  $\mu$ M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1 h. Thereafter, the medium is replaced and ECs are incubated for 48 h. SA- $\beta$ -gal activity is determined by flow cytometry. D) ECs are exposed either to normal or high glucose for 96 h in the presence or absence of Empagliflozin (100 nM) before Western blot analysis of p53, p21, and p16. Results are shown as representative immunoblots (upper panels) and corresponding cumulative data (lower panels). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of n=3-4. \**P* <0.05 vs control NG and #*P* <0.05 vs control HG.

**Figure 2** Empagliflozin prevents the high glucose-induced endothelial dysfunction. ECs are exposed either to normal or high glucose for 96 h in the presence or absence of Empagliflozin (100 nM). A) Western blot analysis is performed to determine the expression level of eNOS, VCAM-1, and Tissue factor. Results are shown as representative immunoblots (upper panels) and corresponding cumulative data (lower panels). B) Electron paramagnetic resonance is used to determine the formation of NO under basal conditions and in response to bradykinin (100 nM). C) Platelet aggregation experiments are performed to determine the inhibitory effect of ECs on U46619-induced platelet aggregation. Representative platelet aggregation curves (upper panels) and corresponding cumulative data (lower panels). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of n=3-4 (A), 3 (B), 4 (C). \**P* <0.05 vs respective control normal glucose and #*P* <0.05 vs control high glucose.

**Figure 3** High glucose causes a redox-sensitive induction of ECs senescence and promotes oxidative stress in ECs involving NADPH oxidase and cyclooxygenases inhibited by Empagliflozin. A) ECs are exposed either with N-acetyl cysteine (NAC, an antioxidant, 1 mM), VAS-2870 (VAS, a NADPH oxidase inhibitor, 5  $\mu$ M), or INDO (Indomethacin, a COX inhibitor, 30  $\mu$ M) for 30 min before the addition of high glucose for 96 h, and the subsequent determination of SA- $\beta$ -gal activity by flow cytometry. B) ECs are exposed to either normal or high glucose for 24 h in the presence or absence of Empagliflozin (100 nM), before dihydroethidium staining. Ethidium fluorescence is determined by confocal microscope. C).

ECs are exposed to normal or a high glucose for 96 h in the presence or absence of Empagliflozin (100 nM) before Western blot analysis of the NADPH oxidase subunits p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, COX 1 and COX 2. Results are shown as representative immunoblots (upper panels) and corresponding cumulative data (lower panels). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of n=4-5. \**P* <0.05 vs control normal glucose and #*P* <0.05 vs control high glucose.

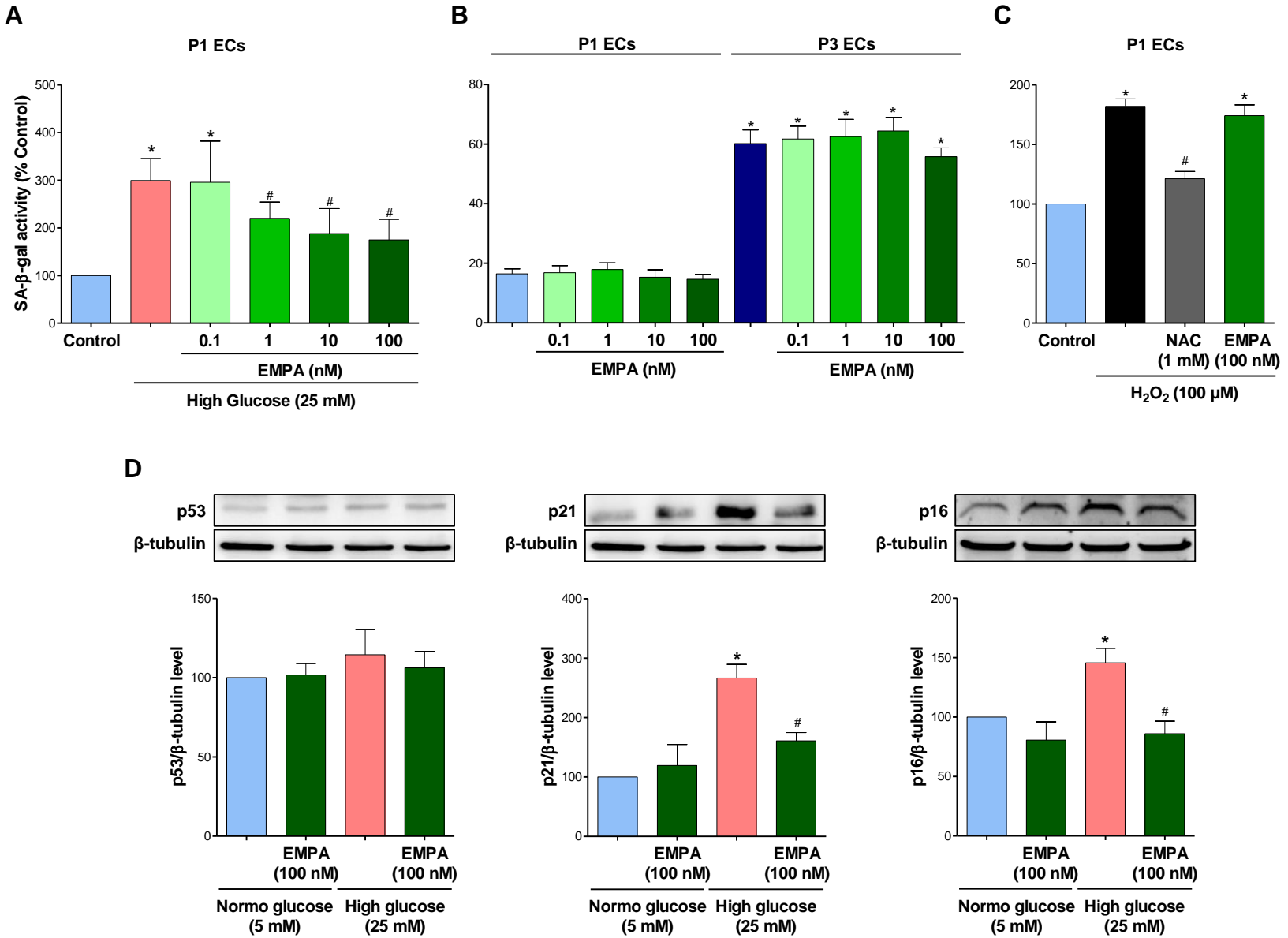
**Figure 4** Upregulation of the local angiotensin system mediates the high glucose-induced ECs senescence, an effect prevented by Empagliflozin. A) ECs are exposed to either an angiotensin-converting enzyme inhibitor (Perindoprilat, 0.1  $\mu$ M) or an AT1R antagonist (Losartan, 30  $\mu$ M) for 30 min before the addition of high glucose for 96 h, and the subsequent determination of SA- $\beta$ -gal activity by flow cytometry. B) ECs are exposed to normal or a high glucose for 96 h in the presence or absence of Empagliflozin (100 nM) before Western blot analysis of angiotensin-conversion enzyme (ACE), and AT1R. Results are shown as representative immunoblots (upper panels) and corresponding cumulative data (lower panels). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of n=3-4. \**P* <0.05 vs control normal glucose and #*P* <0.05 vs control high glucose.

**Figure 5** Empagliflozin does not affect basal glucose entry into ECs but prevents the increased entry into H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- and high glucose-treated ECs. ECs are either untreated or exposed to A) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h, and B) high glucose for 48 h. After a 6-h incubation period in serum-free medium without glucose, ECs are exposed to either Empagliflozin or LX-4211 (a dual SGLT1 and 2 inhibitor) for 30 min before the addition of 2-NBDG for 1 h. Thereafter, the ECs-associated 2-NBDG signal was determined by flow cytometry. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of n=4. \**P* <0.05 vs control normal glucose and #*P* <0.05 vs control H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or high glucose.

**Figure 6** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and high glucose stimulate SGLT2 mRNA and protein expression in ECs. A,B) ECs are exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M) and, thereafter, the expression level of SGLT1 and 2 mRNA was determined after a 1-h incubation period by RT-PCR (A), and SGLT1 and 2 protein after a 24-h period by Western blot analysis (B). C,D) ECs are exposed to high glucose and, thereafter, the expression level of SGLT1 and 2 mRNA was determined after a 4-h incubation period by RT-PCR (C), and SGLT1 and 2 protein after a 96-h period by Western blot analysis (D). Results are shown as representative immunoblots (upper panels) and corresponding cumulative data (lower panels). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of n=3-4. \**P* <0.05 vs respective control.

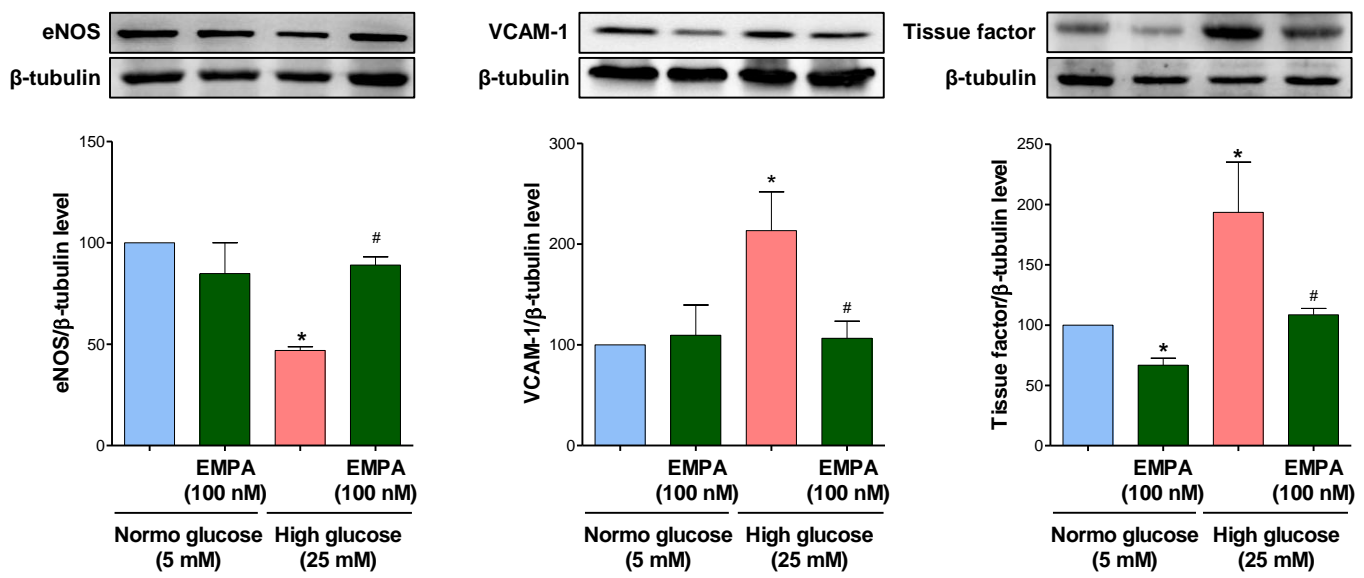
**Figure 7** Upregulation of the expression level of SGLT1 and 2 proteins at arterial sites at risk (aortic cross) compared to those at arterial sites at low risk (thoracic aorta) in rats. The expression level of target proteins in segments of the aortic cross and the thoracic aorta was determined by Western blot analysis. Results are shown as representative immunoblots (upper panels) and corresponding cumulative data (lower panels). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of n=3. \* $P$  <0.05 vs respective thoracic aorta.

**Figure 1**

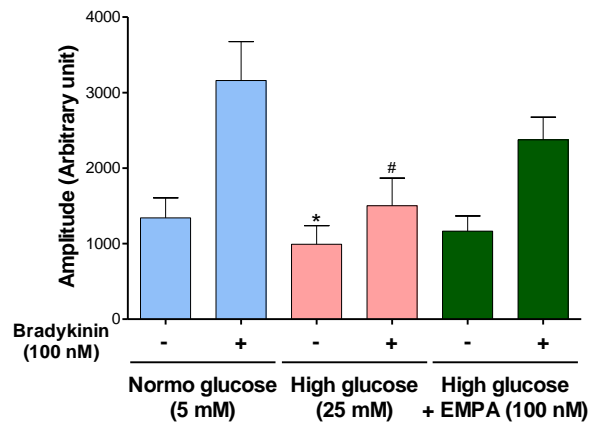


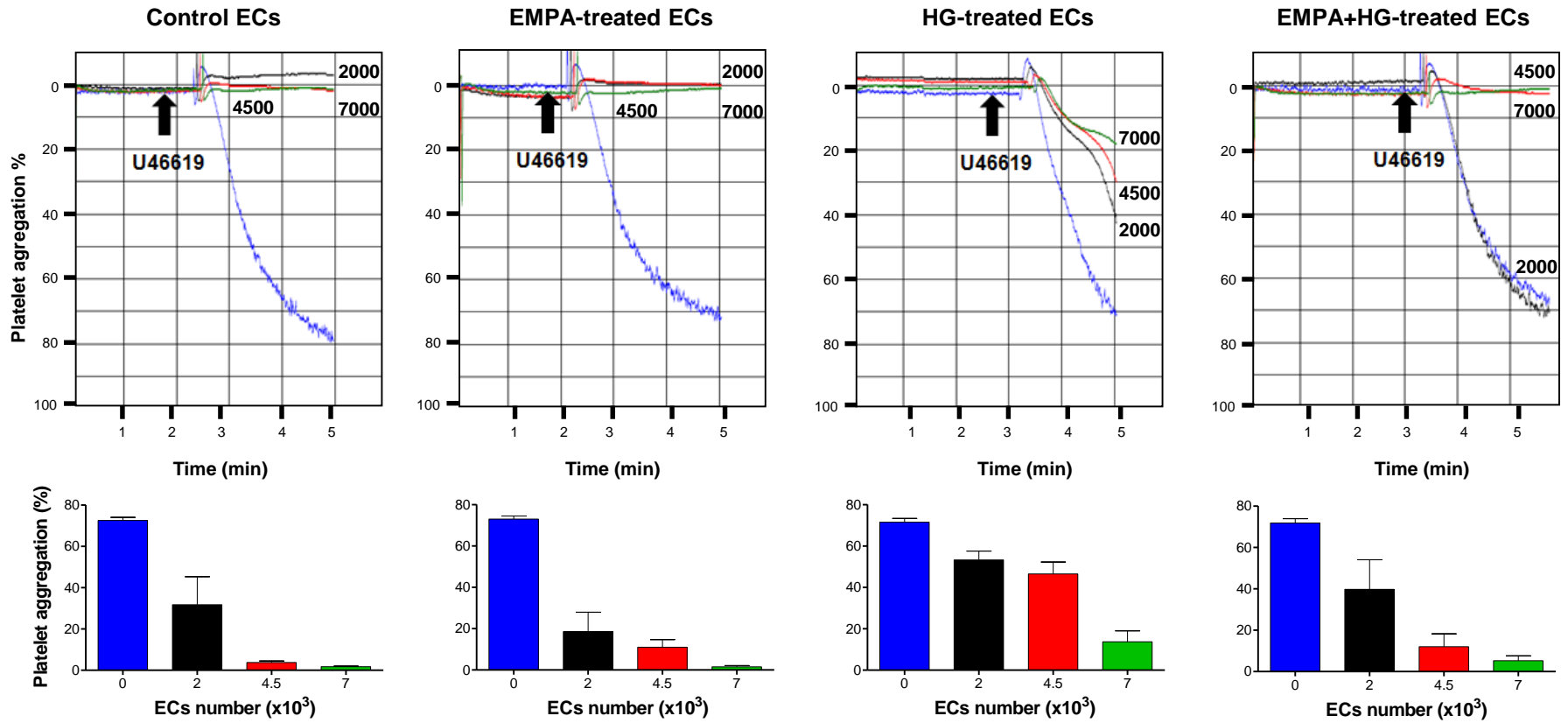
**Figure 2**

**A**



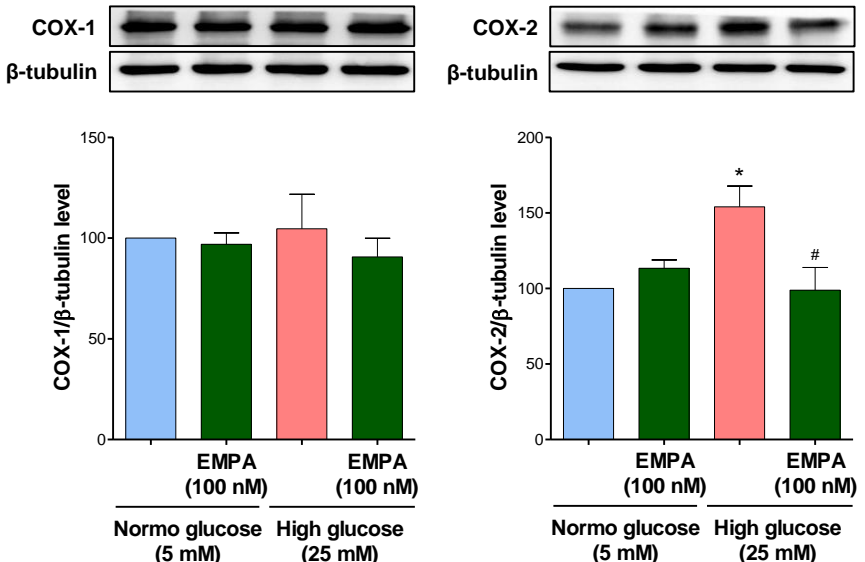
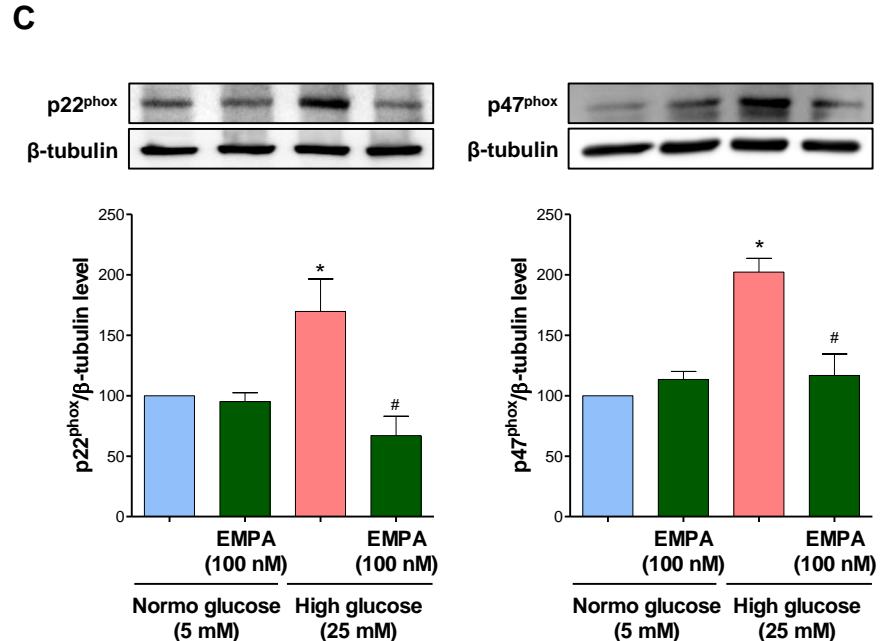
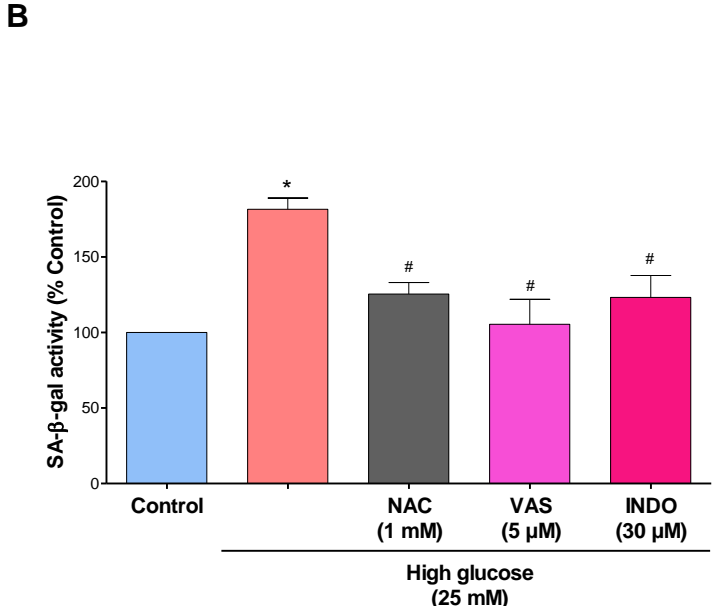
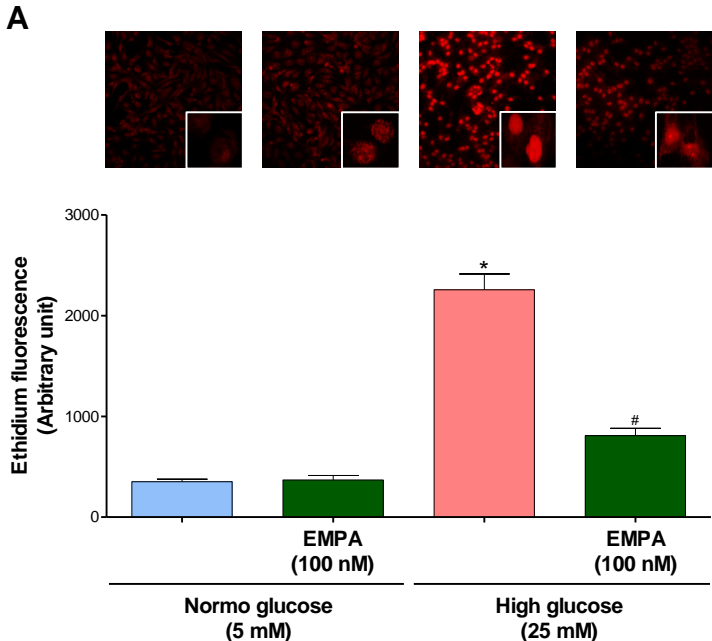
**B**



**C**

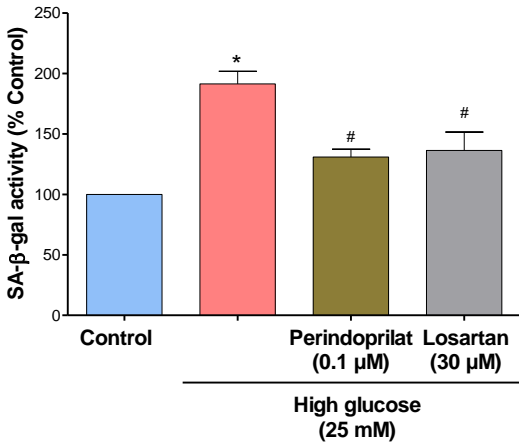


**Figure 3**

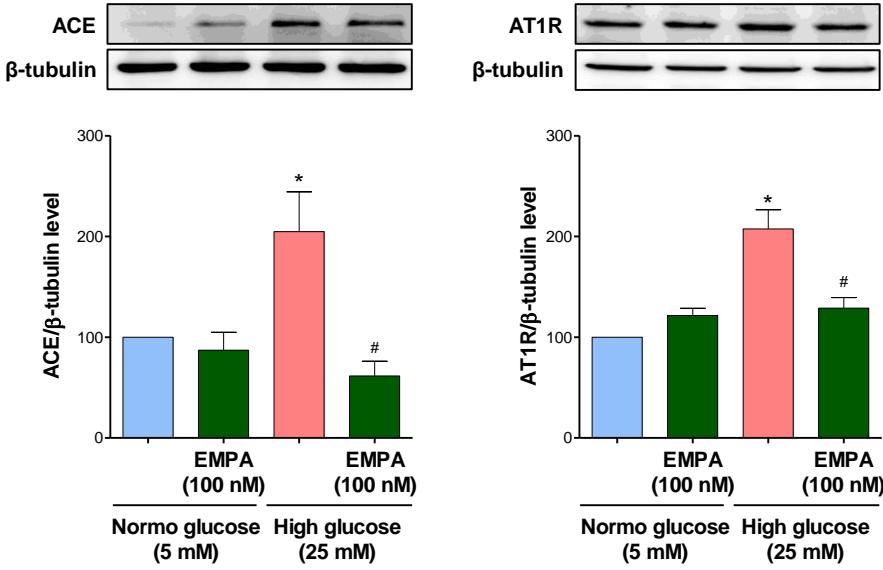


**Figure 4**

**A**

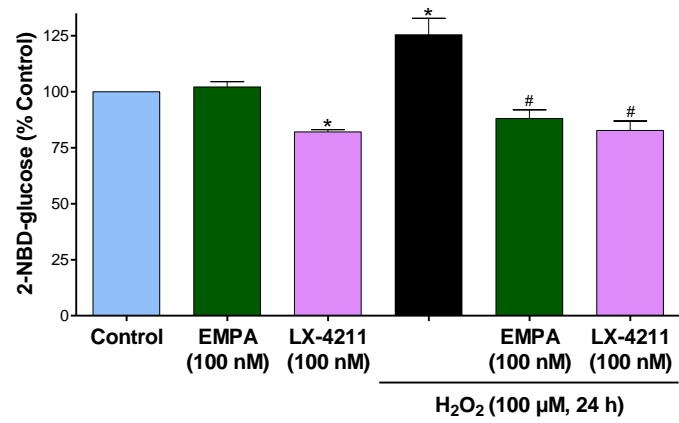


**B**

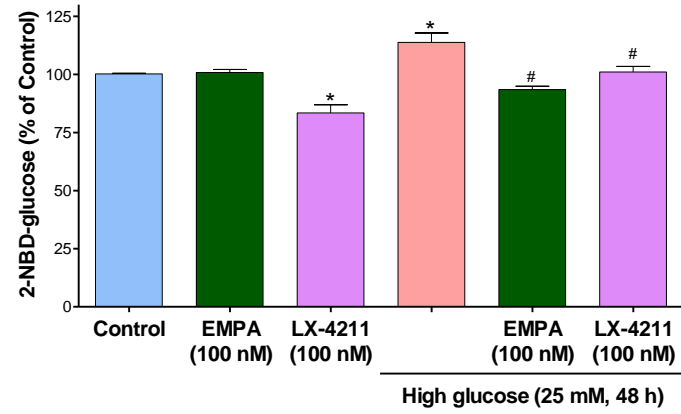


**Figure 5**

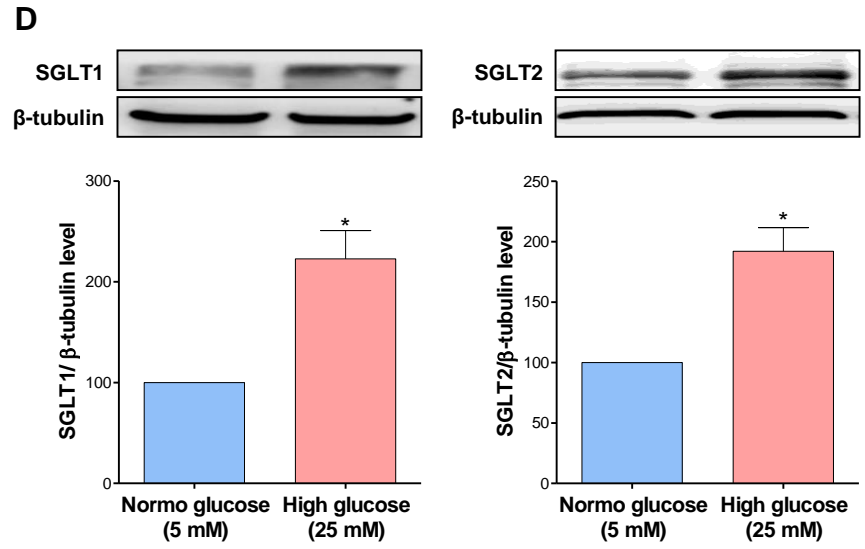
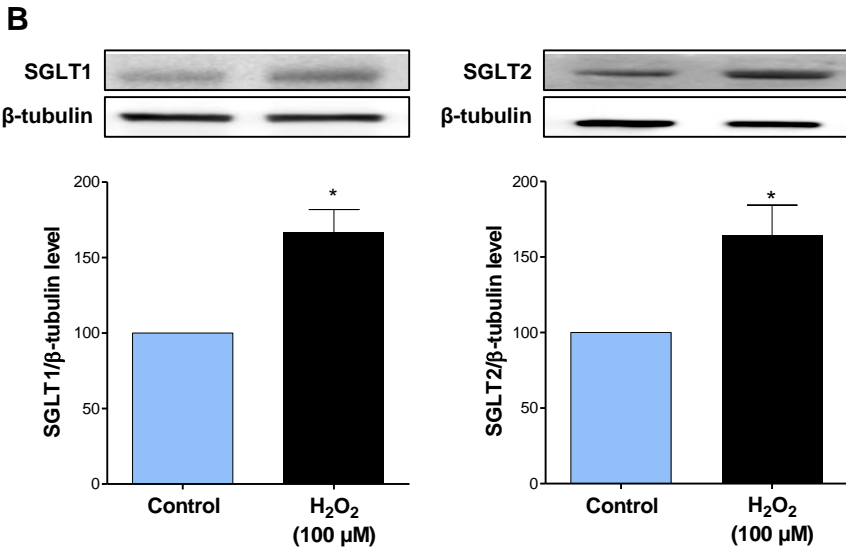
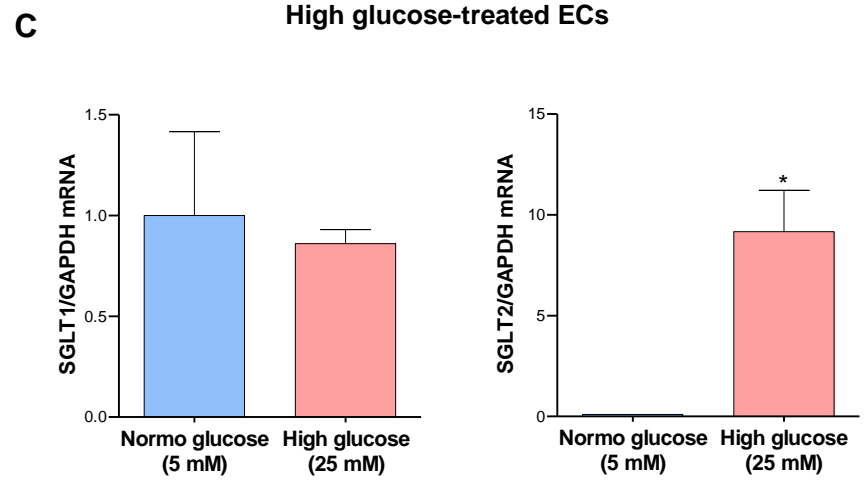
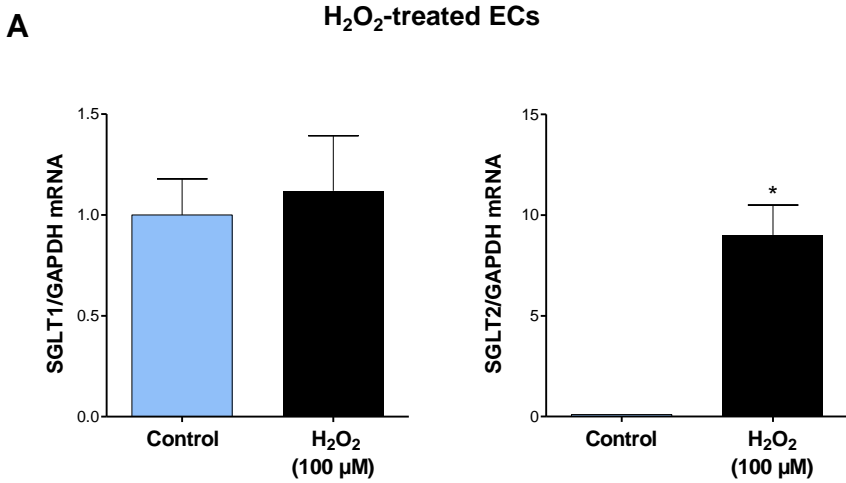
**A**



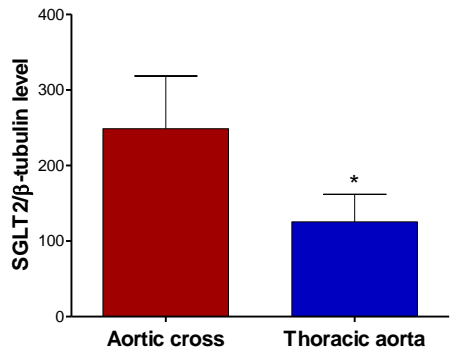
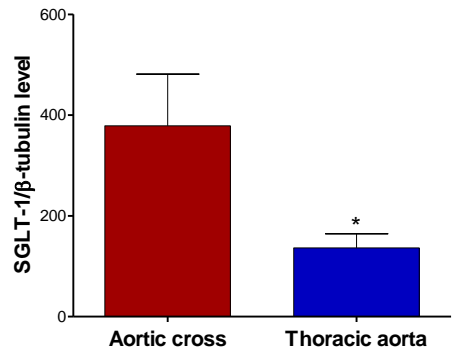
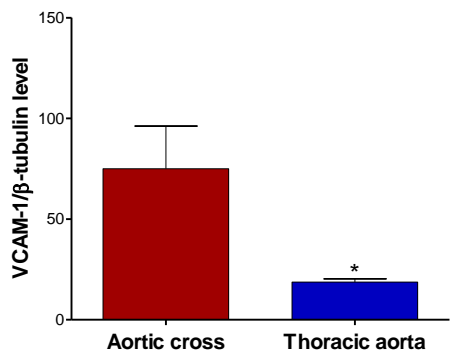
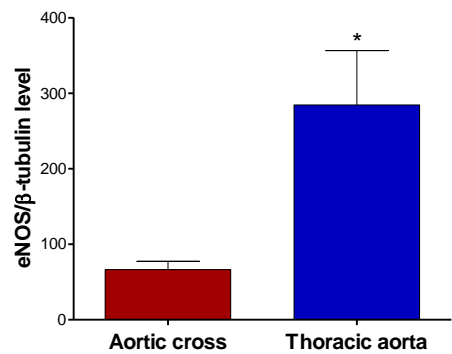
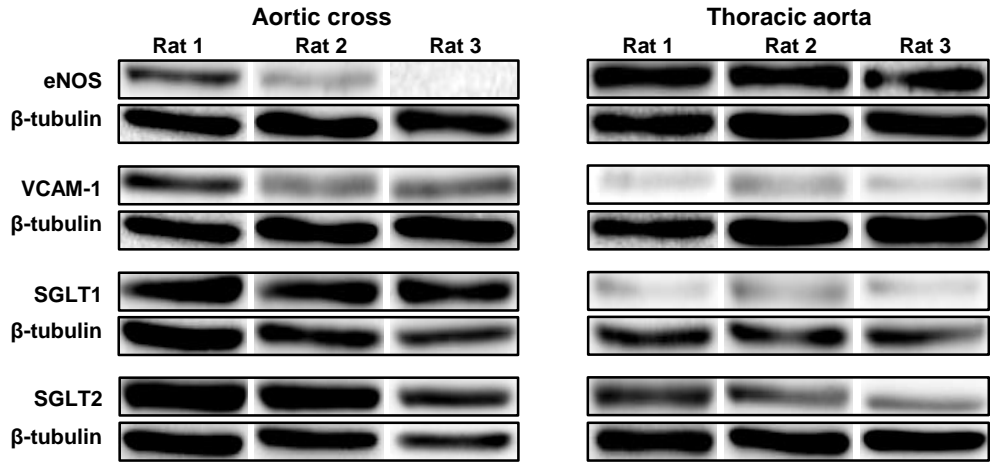
**B**



**Figure 6**



**Figure 7**



## Résultats et conclusion

Les résultats de cette étude indiquent que l'exposition des CEs à des concentrations élevées de glucose (HG) a considérablement augmenté les marqueurs de la sénescence, le stress oxydant et induit la diminution de l'expression et de l'activité de la eNOS comme en témoigne la diminution de formation du NO en réponse à la bradykinine et la diminution de la capacité des CEs à inhiber efficacement l'agrégation plaquettaire. Le HG a également induit l'apparition d'un état pro-athérotrombotique comme en témoigne l'expression accrue de VCAM-1 et du facteur tissulaire, et a activé le système angiotensine local. L'antioxydant (N-acétylcystéine), l'inhibiteur de l'ACE (Perindoprilate) et l'antagoniste de l'AT-1R (Losartan) ont prévenu la sénescence induite par le HG, suggérant un rôle redox sensible du système angiotensine locale dans l'induction de la sénescence endothéliale par le HG. L'Empagliflozine, inhibiteur spécifique de SGLT2, a prévenu la sénescence endothéliale de manière concentration dépendante, diminué la production de ROS, restauré l'expression et l'activité de la eNOS et prévenu l'activation du système angiotensine local. L'étude du transport du glucose a montré que l'Empagliflozine n'a pas affecté l'absorption basale de glucose dans les CE, mais a considérablement réduit celui stimulé par le HG et le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ceci est cohérent avec l'apparition de l'ARNm SGLT2 et l'augmentation du niveau de la protéine SGLT2 dans les CEs exposées au HG et au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'étude de l'expression protéique de SGLT1 et 2 dans l'aorte de rat d'âge moyen, a montré un niveau d'expression accrue de SGLT1 et SGLT2 au niveau de la crosse aortique, zone à risque, caractérisée par une sénescence prématurée, comparé l'aorte thoracique.

En conclusion, cette étude montre une induction de l'expression de SGLT2 dans les CEs, en réponse au stress oxydant et au HG, et *in vivo*, dans les zones artérielles à risque caractérisée par un stress oxydant, ce qui pourrait favoriser l'entrée excessive du glucose et aggraver la glucotoxicité. L'inhibition de SGLT2 par l'Empagliflozine, a protégé les CEs des effets délétères du glucose et prévenu l'activation redox sensible du système angiotensine local. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de SGLT2 pourrait être une stratégie intéressante pour la protection de la fonction endothélie

## **Etude complémentaire**

## Etude complémentaire

Anthocyanin-rich blackcurrant extract prevents replicative and high glucose-induced premature endothelial senescence: Role of Glucose transporters SGLTs. **Sonia Khemais-Benkhiat**, Hyun-Ho Lee, Eugenia Belcastro, Sébastien Gaertner, Gabriella Rasata-Manantena, Christophe Bruckert, Cyril Auger, Florence Toti, and Valérie B. Schini-Kerth.

De nombreuses études expérimentales et cliniques montrent que les produits naturels riches en polyphénols améliorent la fonction endothéliale aussi bien en situation physiologique que pathologique (Schini-Kerth *et al.*, 2011). L'effet bénéfique des polyphénols sur la fonction endothéliale implique plusieurs mécanismes incluant l'activation de la eNOS et une formation accrue de NO, l'inhibition de l'activité et de l'expression d'enzymes pro-oxydantes telle que la NADPH oxydase et la normalisation du système angiotensine local, le tout contribuant à diminuer le stress oxydant vasculaire (Schini-Kerth *et al.*, 2011). Cependant, les mécanismes par lesquels les polyphénols entrent dans les CEs demeurent inconnus. Jin *et al.* ont montré que la delphinidine-3-*O*-glucoside pouvait entrer dans les CEs via le transporteur SGLT1, afin d'inhiber l'apoptose et le stress oxydant induits par les LDL oxydés (Jin *et al.*, 2013). Par ailleurs, la consommation de polyphénols comme les anthocyanines est associée à un risque inférieur de diabète DT2 dans plusieurs études (Guo *et al.*, 2016). Une inhibition compétitive de l'absorption du glucose au niveau des différents transporteurs de glucose par des anthocyanines isolées est décrite dans un modèle cellulaire de l'épithélium intestinal humain (Johnston *et al.*, 2005 ; Manzano *et al.*, 2010).

En continuité avec les articles 1 et 2, l'objectif de cette étude est d'évaluer *in vitro* l'effet protecteur d'un extrait de cassis (BCE), contenant majoritairement 4 anthocyanines, sur la sénescence endothéliale. Deux modèles de sénescence ont été utilisés, un modèle de sénescence prématurée induite par le HG et un modèle de sénescence répliquative.



**Anthocyanin-rich blackcurrant extract prevents replicative and premature endothelial senescence: Role of Glucose transporters SGLTs**

**Sonia Khemais-Benkhiat**, Hyun-Ho Lee, Eugenia Belcastro, Sébastien Gaertner, Gabriella Rasata-Manantena, Christophe Bruckert, Cyril Auger, Florence Toti, Valérie B. Schini-Kerth.

UMR CNRS 7213 Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Illkirch

**Address for correspondence:**

Valérie B. Schini-Kerth, PhD

UMR CNRS 7213, Faculty of Pharmacy

74, route du Rhin

67401 Illkirch, France

Phone: +33 3 68 85 41 27

Fax: +33 3 68 85 43 13

Email: [valerie.schini-kerth@unistra.fr](mailto:valerie.schini-kerth@unistra.fr)

## **Abstract**

In senescent endothelial cells (ECs), polyphenol compounds counteract the redox-sensitive induction of the local angiotensin system, also able to favor the high glucose-induced up-regulation of SGLTs glucose co-transporters, thereby leading to an associated pro-atherothrombotic phenotype. In the present study, we measured the protective effect of an anthocyanin-rich blackcurrant extract (BCE) on the endothelial function and senescence, and characterized the involvement of glucose transporters GLUT1 and SGLT. High glucose-induced premature senescence in young P1 ECs was characterized by increased SA- $\beta$ -galactosidase activity, expression level of p21 and p16 markers, decreased expression and phosphorylation level of eNOS and up-regulation of AT1R. BCE was able to significantly prevent these high glucose-induced modifications. In replicative senescence (P3 ECs), the inhibition of SGLTs significantly impaired the protective effect of BCE on SA- $\beta$ -galactosidase activity, whereas inhibition of GLUTs was without effect. In addition, study of the glucose transport using the fluorescent probe 2-NBDG indicated a main contribution of GLUTs transporters in P1 young ECs and of SGLT transporters in P3 senescent ECs. This was associated with an increased amounts of SGLT1 mRNA in premature or replicative senescent ECs, an up-regulation of SGLT1 expression and a down-regulation of GLUT1 expression in P3 senescent ECs compared to young P1 ECs. Taken together, these results suggest that BCE can significantly prevent the induction of senescence in ECs, and that this protective effect involve the SGLTs glucose transporter.

**Keywords:** Endothelial cells, Senescence, Blackcurrant, SGLTs, GLUTs

## **Introduction**

According to the World Health organization (WHO), cardiovascular diseases are the leading cause of death worldwide and should stay so over the coming decades (World Health Organization 2017). Diet have been shown to be a key element in the induction and/or development of cardiovascular diseases. Indeed, several epidemiological studies have reported a reduced risk of cardiovascular diseases associated with diets rich in fruits and vegetables (Dauchet et al. 2006; He et al. 2006), and regular intake of polyphenol-rich foods such as red wine (Di Castelnuovo et al. 2002; Renaud and de Lorgeril 1992), green tea (Kuriyama et al. 2006), and cocoa and chocolate (Ding et al. 2006; Hooper et al. 2008). Among the various subclasses of phenolic compounds, the anthocyanins, which are pigments responsible for the orange-red to blue-purple colors of fruits such as grape and berries, have been reported for their cardiovascular protective effects (Wallace 2011; Wallace et al. 2016). Indeed, intake of berries rich in anthocyanins have been associated with a reduced risk of CVDs (Basu et al. 2010).

Phenolic compounds have demonstrated beneficial effects in the primary and secondary prevention of cardiovascular diseases due, at least in part, to their capacity to improve the endothelial function (for review, see Schini-Kerth et al. 2010). Previous studies have reported endothelium-dependent relaxations in artery rings in response to fruit juices or extracts from strawberry (Edirisinghe et al. 2008), raspberry (Mullen et al. 2002), blackcurrant (Nakamura et al. 2002), chokeberry (Bell and Gochenaur 2006), cranberry (Maher et al. 2000) and grape-derived products (Fitzpatrick et al. 1993; Schini-Kerth et al. 2008; Schini-Kerth et al. 2010), including purple grape juice (Anselm et al. 2007). In our previous studies using commercial and non-commercial fruit juices and blends indicate that the most active fruit-derived products are predominantly those from berries including blackcurrant, cranberry, aronia, lingonberry, blueberry, and grape (Auger et al. 2011; Auger et al. 2015). The vasorelaxant activity of these fruit-derived products has been attributed predominantly to their ability to induce the

endothelial formation of nitric oxide (NO), a potent vasoprotective factor, and also, in some types of blood vessels such as coronary arteries and the microcirculation, endothelium-dependent hyperpolarization (EDH, (for review, see Schini-Kerth et al. 2010)).

Blackcurrant is interesting as it contains mainly four major anthocyanins. Moreover, blackcurrant intake has been associated with reduced cardiovascular risk factors. Indeed, intake of a fruit juice enriched with blackcurrant press residue was associated with a blood pressure reduction in hypertensive subjects (Tjelle et al. 2015). Moreover, consumption of blackcurrant juice for 6 weeks is associated with an increased in endothelial function, as assessed by flow-mediated dilatation, in healthy subjects who habitually consume less than 2 portions of fruits and vegetables per day (Khan et al. 2014).

Endothelial cell senescence, characterized by an irreversible cell cycle arrest with modified morphology and secretory activity (Foreman and Tang 2003), has been suggested to contribute to endothelial dysfunction, which plays a key role in the initiation and/or progression of cardiovascular diseases such as atherosclerosis and hypertension (Algotsson et al. 1995; Herrera et al. 2010; Jane-Wit and Chun 2012). Indeed, an increased level of vascular senescence has been reported overlying atherosclerotic plaques in coronary arteries and thoracic aortas of patients with ischemic heart diseases (Minamino et al. 2002). Moreover, increased number of senescent endothelial cells have also been observed in animal models of cardiovascular diseases such as the aortic arch of spontaneously hypertensive rats (Han et al. 2012), and in the aorta of diabetic rats (Chen et al. 2002).

Therefore, the aim of the present study was to determine if an anthocyanin-rich blackcurrant extract (BCE) could prevent the induction of endothelial cell senescence using a model of replicative senescence and of premature senescence induced by high glucose concentration, and if so, to determine the underlying mechanism.



## **Materials and methods**

### **Extraction of polyphenols from blackcurrant juice**

Polyphenols were extracted from the blackcurrant juice (*Ribes nigrum*) by liquid exclusion chromatography, according to the following procedure: polyphenolic compounds were first adsorbed on a separative column (Sephadex LH-20), and further harvested by desorption using acidified methanol (1% Trifluoroacetic acid). The solvent was removed by rotary evaporation under vacuum to obtain a dry phenolic extract. The resulting blackcurrant extract (BCE) contains mainly four major anthocyanins: cyanidin-3-*O*-glucoside ( $2.2 \pm 0.1$  mg/g), cyanidin-3-*O*-rutinoside ( $22.1 \pm 1.5$  mg/g), delphinidin-3-*O*-glucoside ( $11.5 \pm 0.6$  mg/g) and delphinidin-3-*O*-rutinoside ( $41.0 \pm 0.6$  mg/g).

### **Isolation of coronary artery endothelial cells (ECs), culture and endothelial senescence models**

Porcine hearts were collected from the local slaughterhouse (SOCOPA, Holtzheim, France). Left circumflex coronary arteries were excised, cleaned and flushed with PBS without calcium to remove remaining blood. To prepare primary cultures, ECs were isolated by collagenase treatment (type I, Worthington, 1 mg/mL for 12 min at 37°C), and cultured in culture dishes containing medium MCDB 131 (Invitrogen) supplemented with fungizone (250 µg/mL), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 U/mL), L-glutamine (2 mM, all from Lonza, Levallois-Perret, France) and 15% fetal calf serum, and grown for 48-72 h (passage 0). Premature senescence was induced at passage 1 by culturing ECs in complete medium containing 25 mM glucose (high glucose, HG:) for 96 h. Control ECs were simultaneously cultured in the normal medium containing 5 mM (NG, normal glucose). Replicative senescence was induced by serial passaging at regular intervals and using a 1:3 ratio as described previously (Khemais-Benkhiat et al., 2016). Cells were detached using trypsin ethylene diamine tetra

acetic acid (trypsin-EDTA; Life Technologies SAS) before passage. In some experiments, BCE was added 30 min before exposure of P1 cells to HG and was added to P3 cells-cultured in HG medium for 48 h before measurements.

### **Measurement of SA- $\beta$ -galactosidase activity**

SA- $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) activity was determined by flow cytometry using the fluorogenic substrate C12FDG (5-dodecanoylamino fluorescein Di- $\beta$ -D-galactopyranoside, Invitrogen, Life Technology, SAS) as previously described (Kurz et al. 2000). ECs were pre-treated with 300  $\mu$ M chloroquine for 1 h to induce lysosomal alkalization before addition of 33  $\mu$ M C12FDG to the culture medium, isolation, washing in PBS and immediate analysis by flow cytometry (FACScan, BD Bioscience, CA, USA). Data were acquired and analyzed using the Cellquest software (Becton Dickinson). Light scatter parameters were used to eliminate dead cells and subcellular debris. The degree of senescence was measured by the mean green fluorescence intensity of the C12-fluorescein product generated by SA- $\beta$ -galactosidase from C12FDG and the proportion of senescent cells estimated using the median fluorescence intensity of the population. Autofluorescence assessed in parallel in unlabeled ECs was negligible.

### **Western blot**

ECs were washed with PBS and then lysed in the extraction buffer (150mM NaCl, 11 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM sodium pyrophosphate, 20 mM NaF, 0.01 mM okadaic acid (Sigma-Aldrich), 20 mM Tris/HCl, pH 7.5), containing a tablet of protease inhibitor (Complete, Roche) and 1% Triton X-100 (Euromedex). 10-30  $\mu$ g of protein extract were applied to a denaturing SDS 10-12% polyacrylamide gel. Separated proteins were electrophoretically transferred onto a nitrocellulose membrane (GE Healthcare Life Sciences). Aspecific binding was prevented by a

1 h incubation at room temperature in PBS containing 5 % bovine serum albumin and 0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich). Membranes were further incubated with the respective primary antibodies: a rabbit polyclonal anti-eNOS (1:1000 dilution; Cell Signaling Technology; cat. n° #9572), a rabbit polyclonal anti-p53 (1:1000 dilution; Santa Cruz; cat. n° SC-6243), a mouse monoclonal anti-p21 (1:500 dilution; Santa Cruz; cat. n° SC-271532), a mouse monoclonal anti-p16 (1:500 dilution; Santa Cruz; cat. n° SC-390485), a rabbit polyclonal anti-angiotensin type 1 receptor (AT1R, 1:1000 dilution; Santa Cruz Technology), a rabbit polyclonal anti-SGLT1 (1:1000 dilution; Santa Cruz; cat. n° SC-98974) or a mouse monoclonal anti- $\beta$ -tubulin (1:10000 dilution; Sigma-Aldrich; cat. n° T7816) overnight at 4°C. After washing, membranes were incubated with the secondary antibody (peroxidase-labeled anti-rabbit or anti-mouse immunoglobulin G, 1:5000 dilution; Cell Signaling Technology; cat. n° #7074, #7076, respectively) at room temperature for 60 min. Pre-stained markers (Euromedex) were used for molecular mass determination. Immunocomplexes were detected by chemiluminescence reaction (ECL; Amersham, Les Ulis, France) using LAS 4000 analyzer (Amersham) followed by densitometric analysis using the Image J software (<http://rsweb.nih.gov/ij/>).

### **SGLT1 mRNA expression**

Total RNAs were isolated from P1 or P3 ECs or from tissues using the mirVANA® Isolation kit (Invitrogen). The mRNAs were then purified from the total RNAs using a poly (dT) primer, in accordance with the manufacturer's instructions (Macherey-Nagel). The intestine sample was used as positive control for SGLT1 expression. cDNA was obtained by reverse transcription of DNase-free RNA templates using QuantiTect® reverse transcription kit (Quiagen). Primer sequences for SGLT1 were:  
5'GTGGGCAGCTCTTCGATTAC 3' (sense); 5'AACACAGGCGGTAGAGATGC3' (antisense), GAPDH was used as a housekeeping gene expression control and detected with



the following primers: 5'ACCACAGTCCATGCCATCAC3'(sense) ;

5'TCCACCACCCTGTTGCTA3' (antisense). qPCR were made in duplicates with a Bio-Rad Real Time PCR System (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette,).

Data were normalized with GAPDH values and expressed as fold change over control.

In some experiments, premature senescence was induced in P1 cells by a 48h treatment with 1 mM L-NAME, a selective inhibitor of the NOS, before RNA extraction as described previously (Khemais-Benkhiat et al. 2015).

### **Measurement of glucose uptake in ECs**

ECs were seeded at a density of  $2 \times 10^5$  cells per well in a 6 well plate and incubated overnight. Then, ECs were incubated in serum-free media for 6 h before being washed once with PBS and incubated with 100  $\mu$ M of 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose (2-NBDG, Life Technologies) for 1 h at 37° C in either sodium containing buffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 10 mM HEPES, pH 7.4) or Na<sup>+</sup>-free buffer with choline chloride replacing sodium chloride. In some experiments, glucose transporter inhibitors were added 30 min before the 2-NBDG probe. Then, ECs were trypsinized and washed once with PBS by centrifuging at 300 g for 5 min at room temperature. Cell pellets were re-suspended in 300  $\mu$ l PBS and 2-NBDG fluorescence was measured in the FITC channel (FL-1) by flow cytometry (FACScan, BD Bioscience, CA, USA). Glucose uptake in cells was represented by the mean fluorescence intensity of the samples. Unstained control was used to optimize FACS settings.

### **Immunolabelling of endothelial SGLTs transporters by fluorescence microscopy**

Cells were cultured in Millicell EZ SLIDE 8-well glass slides (Merck) until confluency and fixed during 30 minutes with 4% (w/v) paraformaldehyde and then incubated with blocking

buffer (PBS containing 1 % BSA (w/v) and 0.5 % Triton X-100 (w/v)) for 30 minutes at room temperature. After buffer removal, cells were incubated with 1:100 dilution of rabbit anti-rat SGLT1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) for 60 minutes at 4 °C. After washing 3 times with PBS, they were further incubated with a 1:250 dilution of a polyclonal goat anti rabbit immunoglobulin G coupled to CF 633 (Alexa Fluor 633 conjugate, Invitrogen) for 60 minutes at room temperature and in the dark. After washing 3 times with PBS, cells were incubated with 1 mg/ml 4',6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Thermo Fisher) during 3 minutes at room temperature, in order to counterstain nuclei and after disassembling, the coverslips were mounted with fluorescent mounting medium (DAKO, S3023, address).

## **Statistical Analysis**

Data are presented as mean  $\pm$  SEM of n different experiments. Mean values were compared using either Student's paired *t* test or ANOVA followed by the Bonferroni *post-hoc* test to identify significant differences between treatments, using GraphPad Prism (version 5.04 for Microsoft Windows. GraphPad software, Inc., San Diego, CA). The difference was considered significant when the *p* value was less than 0.05.

## **Results**

### **High Glucose induces endothelial senescence that is prevented by BCE**

Endothelial senescence was induced in P1 cells after 96 h incubation in HG medium containing 25 mM glucose, as measured by SA- $\beta$ -galactosidase activity. BCE (1  $\mu$ g/mL-10  $\mu$ g/mL) inhibited endothelial premature senescence in a concentration-dependent manner with a significant and complete inhibition at 10  $\mu$ g/mL, whereas BCE had no significant effect in medium containing 5 mM glucose (NG). In the latter condition, senescence level was minimal

and similar to that of untreated cells (Figure 1A). Accordingly, under HG conditions, 10 µg/mL BCE significantly prevented the HG-induced up-regulation of the senescence markers p21 and p16, but not of p53, whereas no significant effect on p53, p21 and p16 could be observed under NG conditions (Figure 1B).

### **BCE delays HG-induced endothelial senescence via increased expression and activity of eNOS and normalization of the local angiotensin system**

Because polyphenolic wine extracts were reported to improve endothelial function in aged rats through the inhibition of redox-sensitive pathways triggering the local angiotensin system (Dal-Ros et al. 2012; Idris Khodja et al. 2012), we examined the impact of BCE on the expression of the angiotensin receptor AT1R, and expression level of eNOS in HG-induced senescent ECs. Western blot analysis indicated that exposure of ECs to HG concentration is associated with a significant decrease in eNOS expression level (Figure 2). Simultaneously, the overexpression of AT1R in HG versus NG conditions was significantly prevented by 10 µg/mL BCE. Interestingly, while no significant variation in eNOS expression could be observed under NG conditions, BCE significantly up-regulated AT1R, possibly owing to the redox-dependent activation of the AT1R expression (Mu et al. 2013).

### **Co-transporters SGLT1 and SGLT2 are involved in the BCE protective effect against replicative endothelial senescence**

Since SGLT1 has been involved in delphinidin-3-*O*-glucosid entry in ECs (Jin et al. 2013), and preliminary data from our team had indicated that SGLTs are overexpressed in ECs exposed to HG (Khemais-Benkhiat et al, submitted), we hypothesized that the anthocyanin compounds from the BCE might trigger a SGLTs-mediated pathway in HG-induced endothelial senescence. We first investigated the impact of SGLTs pharmacological inhibition *in vitro*. To circumvent

the progressive inhibition of glucose uptake by SGLTs inhibitors, we used the replicative senescence model and measured the impact of BCE added to the culture medium. A 48 h treatment of P3 cells by BCE significantly inhibited senescence with a 40 % reduction in SA- $\beta$ -galactosidase activity (figure 3). Inhibition was abolished by LX-4211, a non-selective SGLT1 and SGLT2 inhibitor applied at  $10^{-7}$  M concentration. By contrast, phloretin, an inhibitor of facilitated glucose transport through GLUT transporters had no effect up to 100  $\mu$ M (Figure 3), suggesting the SGLTs involvement in the protective effect of BCE.

### **SGLTs are major contributors to glucose transport in senescent ECs**

To determine the role of SGLTs in endothelial glucose transport, we selectively inhibited glucose transporters in P1 ECs under normal glucose conditions (NG). Using the fluorescent 2-NBDG probe, the whole glucose entry was measured in the presence of sodium, while the induction of SGLTs-dependent glucose transport was confirmed by comparison with transport measurement in  $\text{Na}^+$  free buffer. In the presence of sodium, LX-4211 reduced glucose entry in P1 ECs by 23.73%, indicating a contribution of SGLT1 and/or SGLT2. In the presence of 100  $\mu$ M phloretin, 2-NBDG uptake was diminished by 39.26 %, near to the minimal level observed in the presence of a 25 mM competitive glucose concentration (42.22 %  $p < 0.001$ ,  $n = 3$ ), suggesting that GLUT and SGLTs transporters are both contributing to glucose uptake in P1 cells. Conversely, treatment of senescent P3 ECs by 0.1  $\mu$ M LX-4211 led to a decrease of 2-NBDG uptake by 33.24 % respectively, near to the 38.52 % fall observed in the presence of the competitive 25 mM glucose concentration, suggesting a major contribution of SGLTs. A paradoxical and significant 2-fold enhancement in the entry of 2-NBDG was induced by 100  $\mu$ M phloretin or BCE in P3 ECs, thereby questioning an eventual variation in glucose transporters expression and their respective contribution to the uptake of glucose in senescent cells. By contrast, no significant effect of SGLTs inhibitors was detectable in P1 or P3 ECs

cultured in the absence of sodium whereas the 2 fold increase in glucose entry induced by phloretin treatment was observed (Figure 4 B).

Taken together, these data suggest a preponderant role for SGLT1 and/or SGLT2 in the glucose uptake by senescent ECs, mainly detectable when the other glucose transporters were active, and a lower SGLT contribution to glucose transport in young ECs.

### **SGLTs are up-regulated in endothelial replicative senescence**

Since SGLTs-mediated glucose entry in senescent P3 in ECs appeared higher than in young healthy ECs at P1 (see above and Figure 4), we examined the variations in protein expression levels of SGLTs in the process of replicative senescence. Immunolabelling and confocal microscopy indicated that SGLT1 transporters expression is up-regulated in P3 compared to P1 ECs (Figure 5). This was associated with a 50 % up-regulation of SGLT1 mRNA in P3 ECs. Moreover, Western blot analysis indicated that the up-regulation of SGLT1 expression in P3 ECs is associated with down-regulation of eNOS and GLUT1, the main facilitative glucose transporter in ECs.

### **Discussion**

Several studies have shown that NO inhibits HG-induced endothelial senescence (Hayashi et al., 2006). L-arginine was reported to prevent high glucose-induced senescence in human umbilical vein suggesting a pivotal role for NO production (Zhong et al. 2010). Previous data from our team showed that blackcurrant juice induced potent endothelium-dependent relaxation of porcine coronary arteries (Auger et al. 2011). In both models of premature senescence and replicative senescence investigated herein, BCE appeared to protect ECs from these HG redox-sensitive driven deleterious effects in a SGLTs-dependent manner. Furthermore, we identified a differential expression pattern of GLUT1 and SGLT1 between senescent and young cells, by

Western blot, immunolabelling and RT-PCR. The role of SGLT2 and other isoforms of GLUTs need to be investigated. The impact of SGLTs and GLUTs in senescent P3 cells was further confirmed by the pharmacological inhibition of the glucose transport showing that GLUTs mainly mediated glucose uptake in P1 ECs and that the SGLTs contribution was higher in senescent cells.

Our data are consistent with previous reports showing a normalization of the local angiotensin system by polyphenols *in vitro* and *in vivo* (Dal-Ros et al. 2012; Idris Khodja et al. 2012; Khemais-Benkhiat et al. 2015). However, the effect of BCE on Angiotensin Conversion Enzyme (ACE) expression, known to be overexpressed under HG conditions (Khemais-Benkhiat et al.; submitted), need to be evaluated. We observed a significant up-regulation of the AT1R induced by BCE under NG, possibly owing to the pro-oxidant effect of polyphenols in the pathway leading to endothelial protection (Auger et al. 2010; Ndiaye et al. 2005; Schini-Kerth et al. 2011). Indeed, AT1R expression is redox-sensitive (Banday and Lokhandwala 2011).

Our data extend and confirm the previous data by Jin et al. showing that isolated delphinidine-3-O-glucoside enters ECs via SGLT1 (Jin et al. 2013). Indeed, we demonstrate that SGLTs are involved in the protective effect of BCE anthocyanins in senescent ECs. However, the role of SGLT1 and SGLT2 remain to be clarified.

The hypothesis of a possible competitive inhibition of glucose entry in ECs by BCE was studied in P3 cells by measuring fluorescent glucose transport in the presence of BCE. However, we were unable to demonstrate such inhibition of glucose entry, and a paradoxical increase in glucose uptake was observed. These first data remain to be assessed at different BCE pre-incubation time and concentration in order to establish the kinetics and concentration-response curves of the BCE.

Altogether, our preliminary in vitro data underline a protective effect of BCE in cultured endothelial senescence, presumably, via improved endothelial function and possible normalization of the local angiotensin system. The effect of the BCE seems to be mediated by SGLT1 and/or 2. The study strongly supports the existence of a different profile in the expression and function of glucose transporters between young and senescent ECs in favor of a preferential protection by anthocyanins at sites proved to endothelial senescence.

## References

- Algotsson A, Nordberg A, Winblad B (1995) 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. *The journals of gerontology* 50 (2):M121-127
- Anselm E, Chataigneau M, Ndiaye M, Chataigneau T, Schini-Kerth VB (2007) Grape juice causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of eNOS. *Cardiovasc Res* 73 (2):404-413. doi:S0008-6363(06)00356-7 [pii]
- 10.1016/j.cardiores.2006.08.004
- Auger C, Kim JH, Chabert P, Chaabi M, Anselm E, Lanciaux X, Lobstein A, Schini-Kerth VB (2010) The EGCg-induced redox-sensitive activation of endothelial nitric oxide synthase and relaxation are critically dependent on hydroxyl moieties. *Biochem Biophys Res Commun* 393 (1):162-167. doi:10.1016/j.bbrc.2010.01.112
- Auger C, Kim JH, Trinh S, Chataigneau T, Popken AM, Schini-Kerth VB (2011) Fruit juice-induced endothelium-dependent relaxations in isolated porcine coronary arteries: evaluation of different fruit juices and purees and optimization of a red fruit juice blend. *Food & function* 2 (5):245-250. doi:10.1039/c1fo10040h
- Auger C, Pollet B, Arnold C, Marx C, Schini-Kerth VB (2015) Great heterogeneity of commercial fruit juices to induce endothelium-dependent relaxations in isolated porcine coronary arteries: role of the phenolic content and composition. *Journal of medicinal food* 18 (1):128-136
- Banday AA, Lokhandwala MF (2011) Angiotensin II-mediated biphasic regulation of proximal tubular Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 3 is impaired during oxidative stress. *American journal of physiology Renal physiology* 301 (2):F364-370. doi:10.1152/ajprenal.00121.2011
- Basu A, Rhone M, Lyons TJ (2010) Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutrition reviews* 68 (3):168-177. doi:10.1111/j.1753-4887.2010.00273.x
- Bell DR, Gochenaur K (2006) Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin-rich extracts. *JApplPhysiol* 100 (4):1164-1170
- Chen J, Brodsky SV, Goligorsky DM, Hampel DJ, Li H, Gross SS, Goligorsky MS (2002) Glycated collagen I induces premature senescence-like phenotypic changes in endothelial cells. *Circ Res* 90 (12):1290-1298
- Dal-Ros S, Bronner C, Auger C, Schini-Kerth VB (2012) Red wine polyphenols improve an established aging-related endothelial dysfunction in the mesenteric artery of middle-aged rats: role of oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 419 (2):381-387. doi:10.1016/j.bbrc.2012.02.031
- Dauchet L, Amouyel P, Hercberg S, Dallongeville J (2006) Fruit and vegetable consumption and risk of coronary heart disease: a meta-analysis of cohort studies. *J Nutr* 136 (10):2588-2593
- Di Castelnuovo A, Iacoviello L, Donati MB, De Gaetano G (2002) Meta-analysis of wine and beer consumption in relation to vascular risk. *Circulation* 105 (24):2836-2844
- Ding EL, Hutfless SM, Ding X, Girotra S (2006) Chocolate and prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *Nutr Metab (Lond)* 3:2
- Edirisinghe I, Burton-Freeman B, Varelis P, Kappagoda T (2008) Strawberry extract caused endothelium-dependent relaxation through the activation of PI3 kinase/Akt. *J Agric Food Chem* 56 (20):9383-9390
- Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Coffey RG (1993) Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 265 (2 Pt 2):H774-H778
- Foreman KE, Tang J (2003) Molecular mechanisms of replicative senescence in endothelial cells. *Exp Gerontol* 38 (11-12):1251-1257. doi:S0531556503002304 [pii]



- Han X, Ling S, Gan W, Sun L, Duan J, Xu J-W (2012) 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -d-glucoside ameliorates vascular senescence and improves blood flow involving a mechanism of p53 deacetylation. *Atherosclerosis* 225 (1):76-82. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.08.011>
- He FJ, Nowson CA, MacGregor GA (2006) Fruit and vegetable consumption and stroke: meta-analysis of cohort studies. *Lancet* 367 (9507):320-326. doi:10.1016/S0140-6736(06)68069-0
- Herrera MD, Mingorance C, Rodriguez-Rodriguez R, Alvarez de Sotomayor M (2010) Endothelial dysfunction and aging: an update. *Ageing Res Rev* 9 (2):142-152. doi:S1568-1637(09)00044-0 [pii]
- 10.1016/j.arr.2009.07.002
- Hooper L, Kroon PA, Rimm EB, Cohn JS, Harvey I, Le Cornu KA, Ryder JJ, Hall WL, Cassidy A (2008) Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 88 (1):38-50
- Idris Khodja N, Chataigneau T, Auger C, Schini-Kerth VB (2012) Grape-derived polyphenols improve aging-related endothelial dysfunction in rat mesenteric artery: role of oxidative stress and the angiotensin system. *PLoS One* 7 (2):e32039. doi:10.1371/journal.pone.0032039
- Jane-Wit D, Chun HJ (2012) Mechanisms of dysfunction in senescent pulmonary endothelium. *The journals of gerontology* 67 (3):236-241
- Jin X, Yi L, Chen ML, Chen CY, Chang H, Zhang T, Wang L, Zhu JD, Zhang QY, Mi MT (2013) Delphinidin-3-glucoside protects against oxidized low-density lipoprotein-induced mitochondrial dysfunction in vascular endothelial cells via the sodium-dependent glucose transporter SGLT1. *PLoS One* 8 (7):e68617. doi:10.1371/journal.pone.0068617
- Khan F, Ray S, Craigie AM, Kennedy G, Hill A, Barton KL, Broughton J, Belch JJ (2014) Lowering of oxidative stress improves endothelial function in healthy subjects with habitually low intake of fruit and vegetables: a randomized controlled trial of antioxidant- and polyphenol-rich blackcurrant juice. *Free Radic Biol Med* 72:232-237
- Khemais-Benkhiat S, Idris-Khodja N, Ribeiro TP, Silva GC, Abbas M, Kheloufi M, Lee JO, Toti F, Auger C, Schini-Kerth VB (2015) The Redox-sensitive Induction of the Local Angiotensin System Promotes Both Premature and Replicative Endothelial Senescence: Preventive Effect of a Standardized Crataegus Extract. *The journals of gerontology*. doi:doi: 10.1093/gerona/glv213
- Kuriyama S, Shimazu T, Ohmori K, Kikuchi N, Nakaya N, Nishino Y, Tsubono Y, Tsuji I (2006) Green tea consumption and mortality due to cardiovascular disease, cancer, and all causes in Japan: the Ohsaki study. *JAMA* 296 (10):1255-1265. doi:10.1001/jama.296.10.1255
- Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD (2000) Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* 113 ( Pt 20):3613-3622
- Maher MA, Mataczynski H, Stefaniak HM, Wilson T (2000) Cranberry juice induces nitric oxide-dependent vasodilation in vitro and its infusion transiently reduces blood pressure in anesthetized rats. *Journal of medicinal food* 3 (3):141-147
- Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Ishida Y, Yoshida H, Komuro I (2002) Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation* 105 (13):1541-1544
- Mu X, He K, Sun H, Zhou X, Chang L, Li X, Chu W, Qiao G, Lu Y (2013) Hydrogen peroxide induces overexpression of angiotensin-converting enzyme in human umbilical vein endothelial cells. *Free radical research* 47 (2):116-122. doi:10.3109/10715762.2012.749987
- Mullen W, McGinn J, Lean ME, MacLean MR, Gardner P, Duthie GG, Yokota T, Crozier A (2002) Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. *J Agric Food Chem* 50 (18):5191-5196
- Nakamura Y, Matsumoto H, Todoki K (2002) Endothelium-dependent vasorelaxation induced by black currant concentrate in rat thoracic aorta. *Japanese journal of pharmacology* 89 (1):29-35

- Ndiaye M, Chataigneau M, Lobysheva I, Chataigneau T, Schini-Kerth VB (2005) Red wine polyphenol-induced, endothelium-dependent NO-mediated relaxation is due to the redox-sensitive PI3-kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO-synthase in the isolated porcine coronary artery. *FASEB J* 19 (3):455-457. doi:04-2146fje [pii]
- 10.1096/fj.04-2146fje
- Renaud S, de Lorgeril M (1992) Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339 (8808):1523-1526
- Schini-Kerth VB, Anselm E, Auger C, Chataigneau T, Dal S, Etienne-Selloum N, Kane MO, Kim JH, Walter A (2008) Protection of endothelial function by grape-derived polyphenols. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 102:5-5
- Schini-Kerth VB, Auger C, Etienne-Selloum N, Chataigneau T (2010) Polyphenol-induced endothelium-dependent relaxations role of NO and EDHF. *Adv Pharmacol* 60:133-175. doi:B978-0-12-385061-4.00006-4 [pii]
- 10.1016/B978-0-12-385061-4.00006-4
- Schini-Kerth VB, Etienne-Selloum N, Chataigneau T, Auger C (2011) Vascular protection by natural product-derived polyphenols: in vitro and in vivo evidence. *Planta Med* 77 (11):1161-1167. doi:10.1055/s-0030-1250737
- Tjelle TE, Holtung L, Bohn SK, Aaby K, Thoresen M, Wiik SA, Paur I, Karlsen AS, Retterstol K, Iversen PO, Blomhoff R (2015) Polyphenol-rich juices reduce blood pressure measures in a randomised controlled trial in high normal and hypertensive volunteers. *Br J Nutr* 114 (7):1054-1063
- Wallace TC (2011) Anthocyanins in cardiovascular disease. *Advances in nutrition* 2 (1):1-7. doi:10.3945/an.110.000042
- Wallace TC, Slavin M, Frankenfeld CL (2016) Systematic Review of Anthocyanins and Markers of Cardiovascular Disease. *Nutrients* 8 (1)
- World Health Organization (2017) Cardiovascular Diseases (CVDs). Fact sheet 317. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>. Accessed 24 August 2017
- Zhong W, Zou G, Gu J, Zhang J (2010) L-arginine attenuates high glucose-accelerated senescence in human umbilical vein endothelial cells. *Diabetes Res Clin Pract* 89 (1):38-45. doi:10.1016/j.diabres.2010.03.013

## Figure legends

### **Figure1: BCE prevents high glucose-induced endothelial senescence**

P1 ECs were treated with BCE in medium containing 5 mM glucose (NG) or 25 mM glucose (HG) for 96 h before (A) SA- $\beta$ -galactosidase activity measurement by flow cytometry, or (B) Western blot analysis of expression level of cell cycle regulatory proteins p53, p21 and p16. Results are shown as representative immunoblots (upper panels) and corresponding cumulative data (lower panels). Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of 3 different culture. \*  $p < 0.05$  vs. control and #  $p < 0.05$  vs. high-glucose.

### **Figure 2: BCE increases the expression and activity of eNOS and normalizes the local angiotensin system**

ECs were cultured in medium containing 5 mM glucose (NG) or 25 mM glucose (HG) for 96 h in the presence or absence of BCE (10  $\mu$ g/ml) before Western blot analysis of the expression level of total and phosphorylated eNOS and AT1R. Results are shown as representative immunoblots (upper panels) and corresponding cumulative data (lower panels). Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of 4 different culture. \*  $p < 0.05$  vs. normal glucose and #  $p < 0.05$  vs. high glucose.

### **Figure 3: BCE anti senescent effect is mediated by SGLT1 and SGLT2.**

P3 ECs were pretreated with phloretin (100  $\mu$ M) or LX-4211 (0.1  $\mu$ M) before exposure to BCE (10  $\mu$ g/ml) for 48h and SA- $\beta$ -galactosidase activity measurement. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of 4 different culture. \*  $p < 0.05$  vs. control and #  $p < 0.05$  vs. BCE.

### **Figure 4: Glucose uptake in young and senescent endothelial cells**

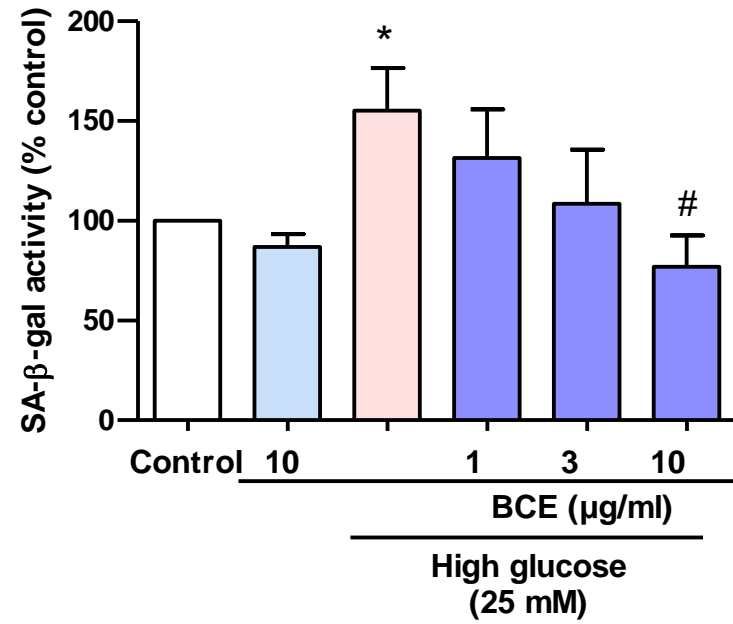
P1 ECs treated with either phloretin (100  $\mu$ M) or LX-4211(0.1  $\mu$ M) 30 min before incubation with the 2-NDBG glucose fluorescent probe, in either sodium-containing buffer (140 mM) or sodium-free buffer. P3 ECs were treated with either phloretin (100  $\mu$ M) or LX-4211(0.1  $\mu$ M) 30 min before incubation with 2-NBDG in either sodium-containing buffer or sodium-free buffer. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of 4 different cultures. \*  $p$  <0.05 vs. control.

**Figure 5: SGLTs are up-regulated in replicative endothelial senescence**

(A) SGLT1 immunofluorescent labeling in P1 and P3 ECs. (B) SGLT1 mRNA level in replicative senescence respectively assessed in P1 ECs and P3 ECs. (C) Protein expression levels of eNOS, SGLT1 AND GLUT1 were analyzed by western blot in P1 and P3 ECs. Results are shown as representative immunoblots (upper panels) and corresponding cumulative data (lower panels). Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of 3-4 different cultures. \*  $p$  <0.05 vs. control.

Figure 1

A



B

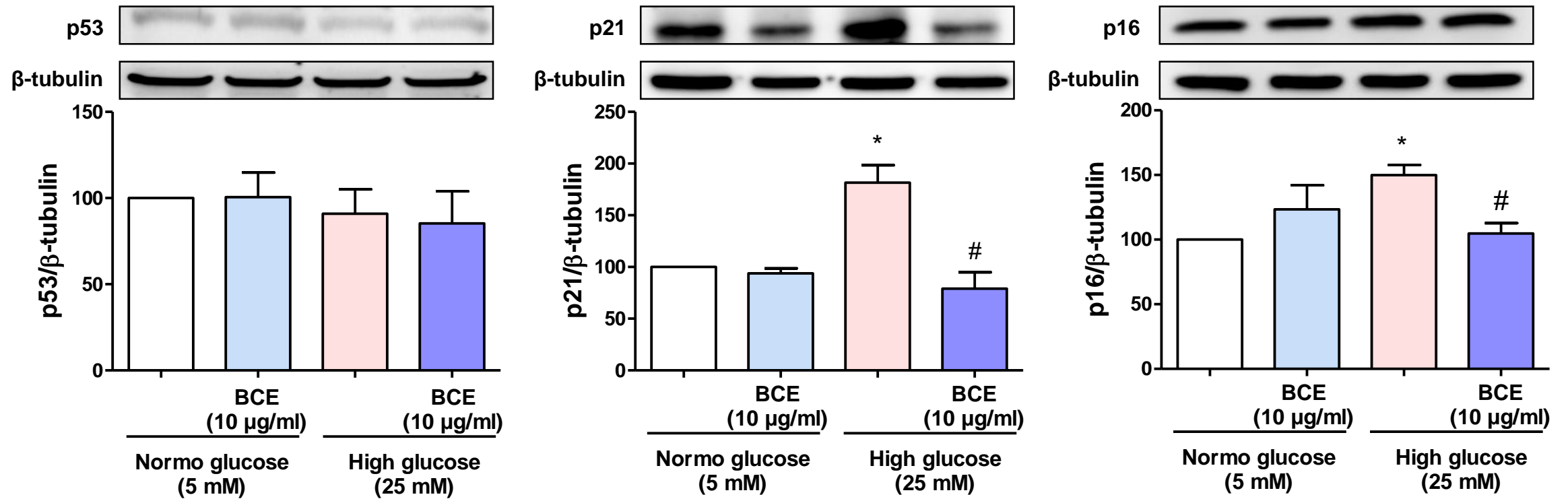


Figure 2

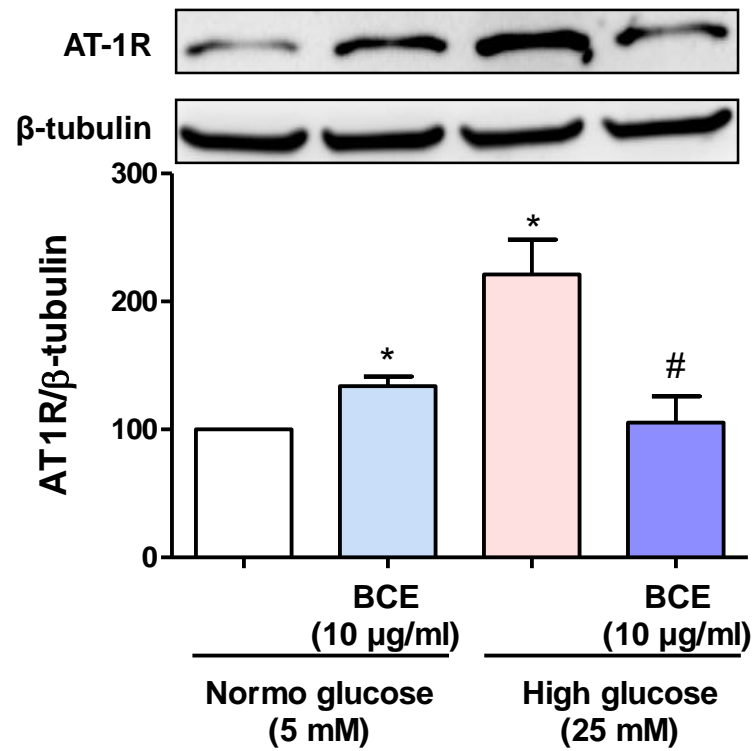
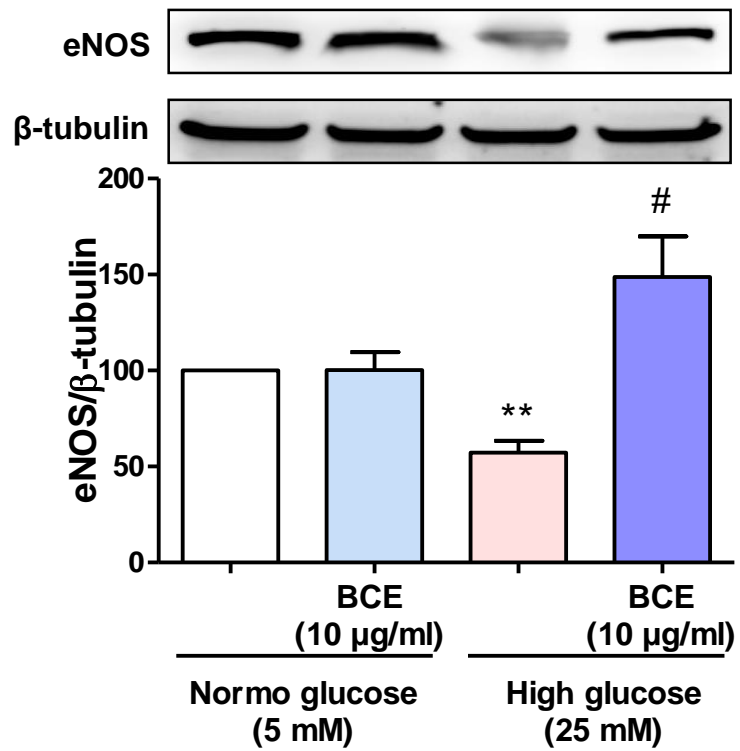


Figure 3

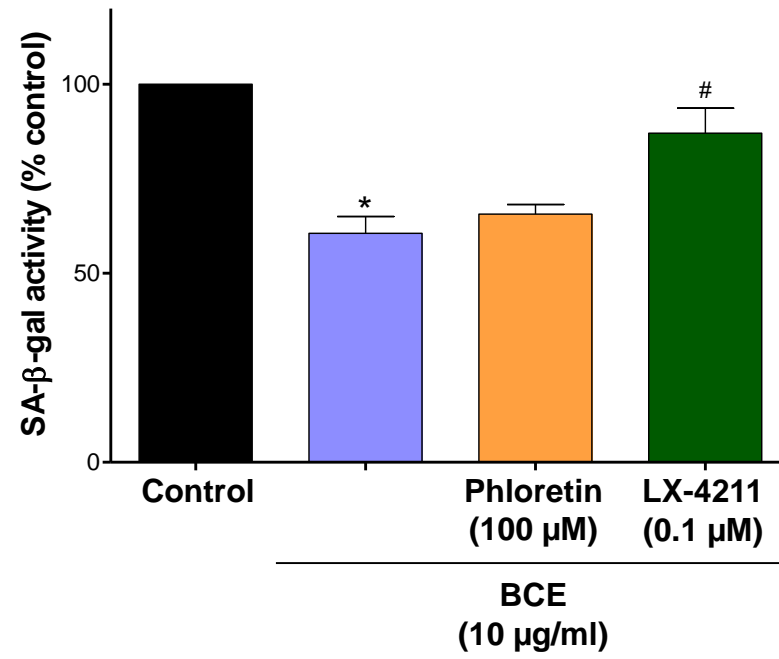


Figure 4

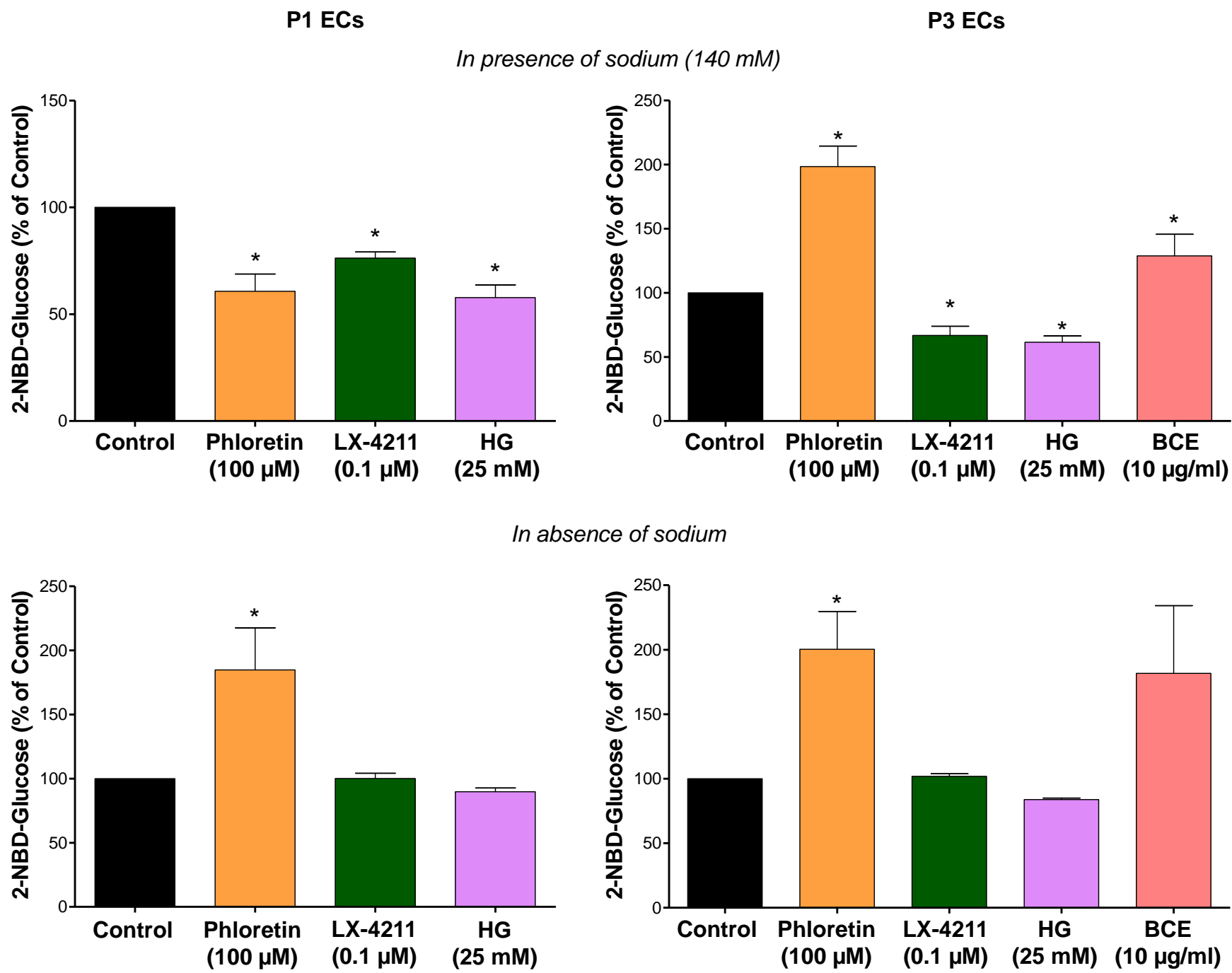
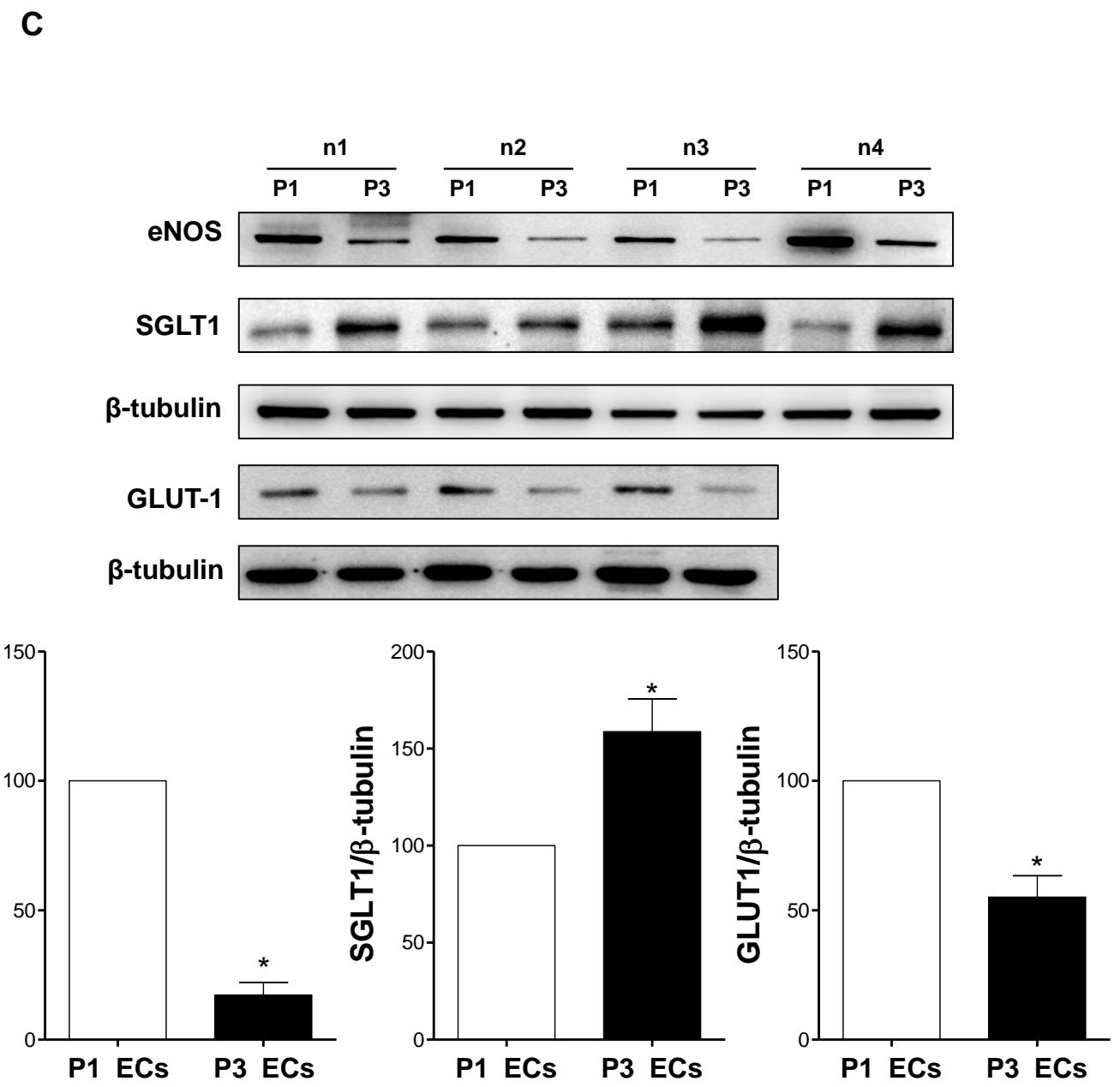
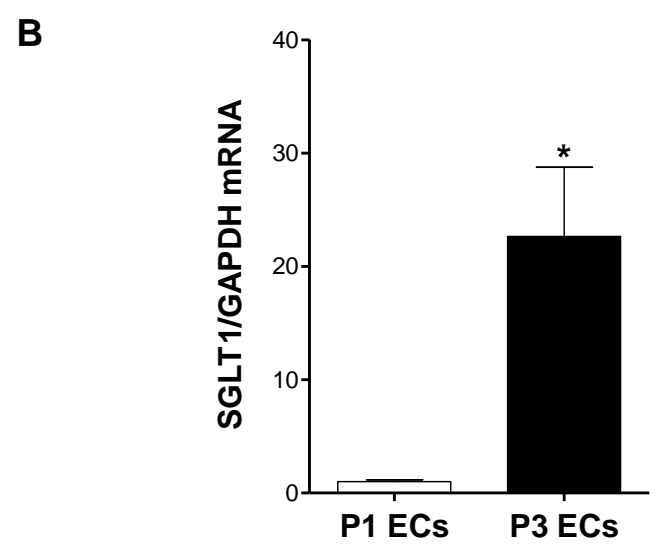
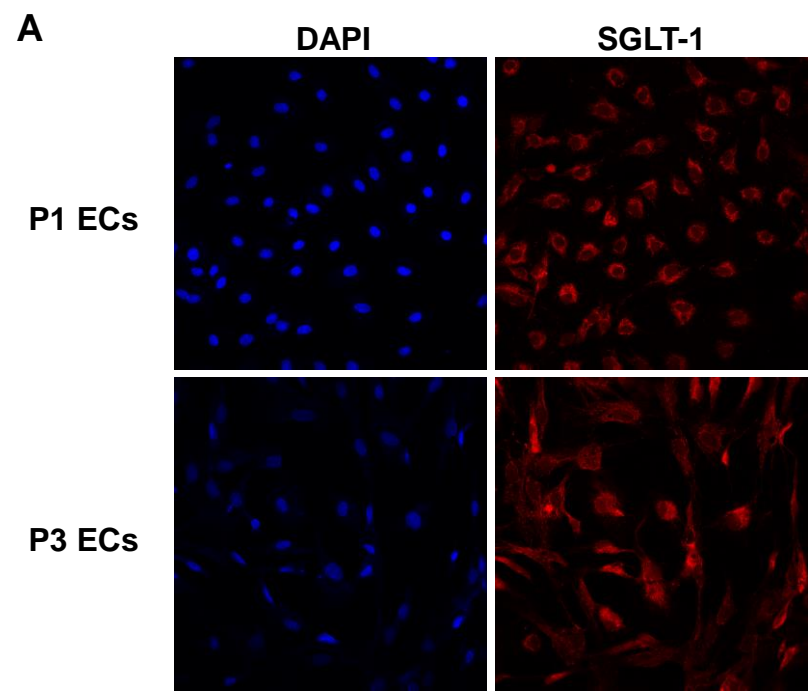




Figure 5



## Résultats et discussion

Les résultats montrent que l'extrait de cassis (BCE) riche en anthocyanines prévient la sénescence endothéliale prématurée induite par le HG de manière concentration dépendante, comme en témoigne la diminution de l'activité SA- $\beta$ -galactosidase et l'expression des protéines inhibitrices du cycle cellulaire (p21, p16). Le BCE a également augmenté l'expression et la phosphorylation de la eNOS et a prévenu la surexpression du AT1R induits par le HG. Afin de déterminer si le mécanisme d'action du BCE implique les transporteurs du glucose, nous avons utilisé un modèle de sénescence répllicative pour éviter une compétition entre le glucose et les anthocyanes vis-à-vis des transporteurs, d'une part et pour éviter l'éventuelle diminution de l'entrée du glucose dans les CEs suite à l'inhibition pharmacologique des différents transporteurs, d'autre part (phénomènes qui pourraient se produire sur le modèle de sénescence induite par le HG). Le BCE a également diminué la sénescence répllicative, cet effet est significativement prévenu par le LX-4211, inhibiteur mixte de SGLT1/2 mais pas par la phlorétine, inhibiteur de GLUTs, suggérant l'implication de SGLT1/2 dans l'effet protecteur du BCE. Ceci est cohérent avec les données de Jin *et al.* montrant un effet SGLT1 dépendant de la delphinidine-3-*O*-glucoside dans les CEs.

L'étude du transport du glucose à l'aide d'un analogue fluorescent du glucose, le 2-NBDG, en présence des inhibiteurs des transporteurs SGLT1/2 et GLUTs dans les CEs jeunes P1 et dans les CEs sénescents à P3, suggère un rôle majoritaire des SGLT1 et 2 dans le transport du glucose dans les CEs sénescents tandis que le transport des GLUTs prédomine dans les CEs jeunes. Ceci est en accord avec l'étude de l'expression génique et protéique des transporteurs montrant une augmentation significative du niveau d'expression de l'ARNm et de la protéine SGLT1 dans les CEs sénescents comparé aux CEs jeunes, parallèlement à une diminution de l'expression de la protéine GLUT1. Ainsi, il existe une expression différentielle des transporteurs SGLT1 et GLUT-1 selon le degré de sénescence des CEs.

L'hypothèse d'une possible inhibition de l'entrée du glucose dans les CEs par les anthocyanines de l'extrait de cassis, du fait des phénomènes de compétitions entre les résidus osidiques conjugués aux polyphénols et le glucose, a été étudiée par la mesure du transport de glucose fluorescent en présence du BCE. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence une inhibition de l'entrée du glucose en présence du BCE dans les cellules P3, mais une augmentation paradoxale de l'entrée du glucose a été observée, et ce indépendamment du

sodium, alors que l'expression protéique des SGLT1 caractérisée par Western blot et par immunomarquage apparaît augmentée dans les cellules P3. Une optimisation du protocole expérimental concernant les concentrations de BCE utilisées ainsi que les temps de pré incubation, est nécessaire. Enfin, il conviendrait, par la suite, de tester si les molécules isolées contenues dans le BCE, à savoir la delphinidine-3-*O*-glucoside, la delphinidine-3-*O*-rutinoside, la cyanidine-3-*O*-glucoside et la cyanidine-3-*O*-rutinoside, sont impliquées dans l'effet préventif de BCE contre l'induction de la sénescence, ainsi que l'implication de SGLT1 dans leurs effets respectifs, et de déterminer le rôle du glucoside conjugué dans l'effet SGLT1 dépendant des anthocyanines en comparaison avec une aglycone delphinidine-*N*-cyanidine ainsi qu'une structure polyphénolique différente telle que les catéchines.

Plusieurs approches expérimentales *in vivo* seront également nécessaires pour mieux caractériser les effets bénéfiques du BCE sur la sénescence endothéliale induite par le glucose, notamment dans les modèles animaux par exemple chez les rats diabétiques traités par les polyphénols.

En conclusion, cette étude montre un effet protecteur du BCE dans les CEs sénescents, vraisemblablement, via l'amélioration de la fonction endothéliale et la normalisation du système angiotensine local. L'effet du BCE semble être au moins en partie dépendant des transporteurs SGLT1/2. L'étude est fortement en faveur de l'existence d'un profil différent dans l'expression et la fonction des transporteurs du glucose entre les CEs jeunes et les CEs sénescents. Les CEs sénescents expriment préférentiellement le SGLT1, et pourraient donc être une cible préférentielle des anthocyanines. Ceci pourrait promouvoir le ciblage des CEs pathologiques et des zones artérielles à risque, pour une meilleure protection endothéliale et vasculaire par certains produits naturels comme le jus de cassis.

## **Discussion**

## Discussion

Le travail présenté dans cette thèse s'articule autour de trois approches différentes et complémentaires de la dysfonction endothéliale liée à la sénescence au cours du vieillissement physiologique, du vieillissement accéléré par le HG et la prévention pharmacologique de cette dysfonction endothéliale par les anthocyanines. L'ensemble des données a permis d'identifier différents acteurs moléculaires de la sénescence et de la dysfonction endothéliale et d'établir un profil caractéristique de l'endothélium pathologique et d'identifier de potentielles cibles thérapeutiques.

### **Vieillesse physiologique : Rôle du système angiotensine local**

La sénescence est caractérisée par un arrêt irréversible de la division cellulaire accompagnée par une altération de l'expression génique et protéique. Au niveau de la cellule endothéliale, ces altérations conduisent à un endothélium dysfonctionnel. En effet, une surexpression ciblée de p53, responsable de l'arrêt de la division, dans l'endothélium est associée à une diminution des relaxations endothélium-dépendante dans des anneaux aortiques, avec une réduction de la biodisponibilité du NO (Kim *et al.*, 2008). En revanche, la transfection des CEs par la télomérase, afin de contrecarrer la sénescence répliquative, retarde le déficit lié à l'âge au niveau de l'expression de la eNOS et augmente la formation de NO (Matsushita *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent un rôle clé de la sénescence dans l'induction de la dysfonction endothéliale, laquelle favorise le développement de l'athérosclérose.

La sénescence endothéliale a été observée *in vivo* et contribue à la pathogenèse des maladies cardiovasculaires. Des CEs sénescents ont été détectées dans les artères carotides de lapin, après une dénudation endothéliale répétée par sonde à ballonnet (Fenten *et al.*, 2001), au niveau de l'aorte de rats diabétiques (Brodsky *et al.*, 2004 ; Chen *et al.*, 2002), hypertendus, des artères coronaires de patients atteints d'une cardiopathie ischémique et recouvrant les plaques d'athérosclérose (Burrig, 1991 ; Minamino *et al.*, 2002).

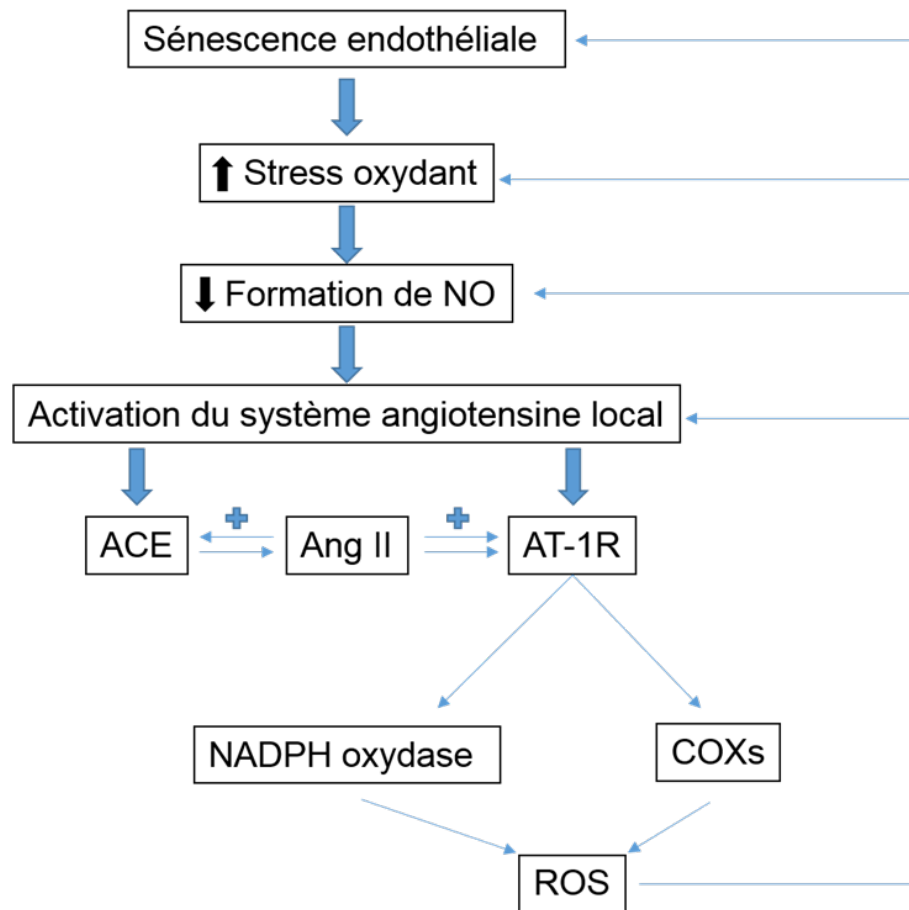
L'activation du système rénine-angiotensine (RAS) est associée au vieillissement physiologique et à de nombreuses pathologies telles que l'hypertension (Nickenig *et al.*, 1998 ; Touyz *et al.*, 2003), l'hypercholestérolémie (Daugherty *et al.*, 2008), le diabète (ref) et l'athérosclérose (Warnholtz *et al.*, 1999 ; Ohishi *et al.*, 2010). Il est bien établi que l'Ang II joue un rôle critique

dans la régulation de nombreux signaux contribuant au vieillissement vasculaire via le stress oxydant, l'inflammation, le remodelage vasculaire, la réponse pro coagulante (cf introduction). Cependant, les mécanismes d'activation du système angiotensine lors du vieillissement vasculaire ne sont pas entièrement compris.

Dans la première étude nous avons montré un rôle important de l'activation du système angiotensine local dans la cascade de signalisation menant à la sénescence et la dysfonction endothéliale. Plusieurs groupes de recherche ont utilisé la sénescence cellulaire comme un modèle cellulaire du vieillissement chez l'homme. Nous avons utilisé un modèle de sénescence répllicative induit par passage séquentiel des CEs reflétant ainsi le vieillissement physiologique. *In vitro*, la sénescence répllicative des CEs est accompagnée par l'induction progressive d'un état pro-oxydant au fur et à mesure des passages, déclenchant la diminution de la formation et de la biodisponibilité du NO. Nos résultats montrent que la diminution du NO dans les CEs que ce soit par approche indirecte (suite au passage séquentiel) ou directe (après un traitement avec l'inhibiteur de la eNOS) active le système angiotensine local, comme en témoigne la surexpression de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) ainsi que du récepteur AT-1 de l'angiotensine (AT-1R). Etant donné que L'angiotensinogène systémique est présent dans le milieu de culture supplémenté en sérum fœtal bovin, et l'angiotensinogène local peut également être sécrété par les CEs (Wu *et al.*, 2015), la CE dispose donc de tous les acteurs pour accroître sa production d'ang II. Cette dernière via son récepteur AT-1, active la NADPH oxydase et les COXs, principales sources enzymatiques de ROS dans la paroi vasculaire, créant ainsi un cercle vicieux dans lequel le stress oxydant maintient l'induction de la sénescence et la dysfonction endothéliale, et permet d'activer à nouveau le système angiotensine local. De plus, l'Ang II elle-même peut réguler l'expression des différentes composantes du RAS. Il a été montré que l'Ang II augmente l'expression de l'angiotensinogène, de la rénine, de l'ACE et du AT-1R dans les CML, les cardiomyocytes, les fibroblastes cardiaques et les cellules épithéliales rénales (Malhotra *et al.*, 1999 ; Yaghini *et al.*, 2010 ; Koka *et al.*, 2008 ; Anupama *et al.*, 2016) en faveur d'une boucle de rétrocontrôle positive.

Le rôle redox-sensible du système angiotensine local dans l'induction de la sénescence endothéliale est illustré par le fait que le traitement des CEs sénescents avec des agents ayant une action antioxydant comme la NAC, l'inhibiteur de la NADPH oxydase (VAS-2870) et l'inhibiteur de COX (Indométacine) a prévenu l'activation du système angiotensine local, la surexpression des COXs et de la NADPH oxydase, la dysfonction endothéliale et la sénescence répllicative. De plus, le traitement des CEs sénescents avec des inhibiteurs du système

angiotensine (Losartan et Perindoprilate) a diminué les marqueurs de la senescence et prévenu la surexpression des composantes du RAS induite par le L-NAME. Le fait que Losartan et le Perindoprilate ont prévenu l'augmentation de l'expression du AT-1R et ACE dans les CEs sénescents, indique une production locale d'Ang II qui, à son tour, augmente l'expression AT-1R et de l'ACE dans ces cellules et exacerbe l'action pro oxydante et pro sénescence de l'Ang II. Une preuve directe de l'activation du RAS, pourrait être obtenue par la détermination des concentrations d'angiotensinogène et d'Ang II dans le surnageant des CEs sénescents aurait été judicieuse. Un effet similaire a été observé dans des fibroblastes cardiaques où le Candésartan, antagoniste de AT1R, et l'Enalapril, inhibiteur de l'ACE ont aboli l'augmentation de l'ARNm et de la protéine AT-1R induite par le traitement H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Anupama *et al.*, 2016). La mesure de l'Ang II dans le milieu de culture a montré que l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entraîne une augmentation de 5 fois de l'expression de l'ARNm de l'angiotensinogène et une augmentation de 3 fois des niveaux d'Ang II sécrétés. En outre, l'augmentation de l'expression de l'ARNm et de la protéine AT-1R induite par l'Ang II est abolie par un inhibiteur de la NADPH oxydase, montrant que l'Ang II augmente l'expression du AT-1R via un mécanisme ROS-NADPH oxydase-dépendant (Anupama *et al.*, 2016).



**Figure 22 : Schéma récapitulant le rôle du système angiotensine local dans l'induction de la sénescence**

Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature qui ont montré que le stress oxydant régule à la fois l'expression de l'ACE et de l'AT-1R dans les CEs et les CML (Li *et al.*, 2000 ; Mu *et al.*, 2013). L'augmentation de l'expression du AT-1R par le stress oxydant semble impliquer le facteur de transcription NF-κB. En effet, le promoteur du gène AT-1R présente un site de liaison consensus pour NF-κB (Heinemeyer *et al.*, 1998). Il a été montré que le stress oxydant n'a pas augmenté l'expression du AT-1R dans les CML aortiques humaines transfectées par un siARN contre la sous-unité p65 de NF-κB (Siddhartha *et al.*, 2014). En outre, le traitement des rats SHR (spontaneously hypertensive rats) avec un inhibiteur de NFκB, le pyrrolidine dithiocarbamate, a normalisé l'expression AT-1R et a atténué considérablement le développement de l'hypertension chez ces rats (Siddhartha *et al.*, 2014).



Notre étude montrant le rôle de l'Ang II dans la sénescence endothéliale est en accord avec les connaissances actuelles. En effet, plusieurs groupes de recherche ont utilisé l'Ang II comme inducteur de la sénescence endothéliale *in vitro* (Kunieda *et al.*, 2006, Shan *et al.*, 2014). *In vivo*, les composantes du système rénine-angiotensine augmentent avec le vieillissement et contribuent à la pathogenèse de l'artériosclérose et de l'athérosclérose (Wang *et al.*, 2003 ; Warnholtz *et al.*, 1999). De plus, de nombreuses études cliniques telles que l'étude HOPE, EUROPA, PEACE, ELITE, CHARM, ont montré que l'inhibition de la production et/ou de l'activité de l'Ang II par les IECs et les Sartans, respectivement, a permis de réduire la morbidité et la mortalité des maladies cardiovasculaires chez des patients ayant un risque cardiovasculaire accru (Brown *et al.*, 2005 ; Najjar *et al.*, 2005).

Nos résultats dévoilent un nouveau bénéfice des inhibiteurs du RAS à savoir la prévention de la sénescence endothéliale, acteur précoce majeur dans la pathogenèse des maladies cardiovasculaires liées à l'âge.

De nombreuses études épidémiologiques avaient montré une diminution de la morbi-mortalité cardiovasculaire suite à la consommation de produits riches en polyphénols (Hertog *et al.*, 1993; 1995; Yamagata *et al.*, 2015; Artero *et al.*, 2015; Patel *et al.*, 2013; Corti *et al.*, 2009). Nous avons montré que le traitement des CEs sénescents avec un extrait de Crataegus WS1442, riche en polyphénols anti oxydants et puissant stimulateur de la formation endothéliale de NO, a diminué le stress oxydant, prévenu l'activation du système angiotensine local, retardé la sénescence répliquative et amélioré l'expression de la eNOS. Cet effet protecteur de l'extrait de Crataegus semble être dépendant de la eNOS, car il a été aboli par le blocage de la formation de NO par le L-NAME. Nos résultats suggèrent que les polyphénols pourraient protéger des MCV en retardant l'induction de la sénescence endothéliale via l'augmentation de la formation de NO. Plusieurs études ont déjà montré que le NO contrecarre la sénescence endothéliale. Des études *in vitro* ont montré que l'apport exogène de NO ou de molécules augmentant sa production endogène, diminue la sénescence endothéliale. En effet, le traitement des CEs par un donneur de NO, active la télomérase et retarde la sénescence répliquative (Vasa *et al.*, 2000). De même, le traitement des CEs par L-arginine prévient la sénescence endothéliale prématurée induite par le HG (Hayashi *et al.*, 2006). L'exposition des HUVEC à des concentrations croissantes d'Ang II induit l'apoptose des CEs via l'activation de la caspase 3 (un effecteur central des voies apoptotiques). Les donneurs de NO inhibent totalement l'apoptose induite par l'Ang II et préviennent l'activation de la caspase-3 (Dimmeler *et al.*, 1997). N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine méthyl ester

D'autres composés polyphénoliques ont également montré un effet bénéfique sur la sénescence endothéliale. En effet, un extrait polyphénolique de vin rouge a réduit la sénescence des CEs après exposition au hydroperoxyde de t-butyle (Botden *et al.*, 2012). De même, le resvératrol a prévenu la sénescence des CEs induite par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kao *et al.*, 2010). L'effet protecteur de l'extrait de Crataegus sur la sénescence endothéliale a été observé à des concentrations très faibles (1 µg/mL). Cette concentration est cliniquement pertinente car elle se rapproche des concentrations plasmatiques retrouvées après ingestion de produits naturels riche en polyphénols. En effet, des concentrations de l'ordre de 1 à 2 µg/ml de polyphénols ont été retrouvées dans le plasma après la prise d'un verre de vin rouge (ref).

Nos résultats sont en accord avec les résultats d'autres groupes de recherche suggérant que la diminution de la formation de NO constitue un événement clé précoce qui déclenche la cascade de signalisation conduisant à la sénescence endothéliale.

### **Viellissement accéléré par l'hyperglycémie : Rôle des transporteurs SGLTs et du système angiotensine**

L'exposition chronique des CEs à l'hyperglycémie est un élément clé qui accélère le vieillissement vasculaire et contribue à l'initiation et au développement des complications vasculaires chez les diabétiques.

Récemment, les inhibiteurs des transporteurs SGLT2 ont montré des effets CV bénéfiques chez l'homme et l'animal. Cependant le rôle des SGLT2 endothéliaux dans les complications vasculaires lié au diabète est mal connu. D'autant que le SGLT2 n'a pas été détecté dans les CEs saines (Han *et al.*, 2015), contrairement au SGLT1 (Elfeber *et al.*, 2004).

Les résultats présentés dans le deuxième article révèlent un rôle majeur de SGLT2 dans l'entrée de glucose dans les CEs menant à la sénescence et à la dysfonction endothéliale. En effet, la sénescence endothéliale induite par le HG est associée à un important stress oxydant, à une diminution de la formation endothéliale de NO et à l'activation conséquente du système angiotensine local. Cette dysfonction endothéliale se traduit par une diminution de la capacité des CEs à inhiber efficacement l'agrégation plaquettaire et l'expression des molécules pro-athérotrombotiques telles que le facteur tissulaire, initiateur endothélial de la cascade de coagulation, et la molécule d'adhésion, VCAM-1. L'Empagliflozine, inhibiteur sélectif de SGLT2 a très efficacement prévenu la glucotoxicité des CEs comme en témoigne la diminution

des marqueurs de la sénescence, la normalisation du stress oxydant, de l'expression de molécules athérotrombotiques et des composantes du système angiotensine local et le maintien de la formation et de la fonction du NO endothélial. L'effet inhibiteur de l'Empagliflozine sur la sénescence induite par le HG est dépendant de la concentration avec une inhibition de 40% observée avec une concentration de 100 nM.

Pour obtenir de l'évidence direct de l'implication des transporteurs SGLT2 dans cet effet, nous avons étudié l'expression génique et protéique ainsi que la fonction des SGLTs dans les CEs. Avant de vérifier si ces transporteurs sont exprimés dans les CEs, la spécificité des amorces et des anticorps a été validée en montrant une expression de SGLT1 et SGLT2 dans le rein et seulement une expression de SGLT1 dans l'intestin. De plus, l'analyse par Western blot a révélé un signal spécifique au poids moléculaire attendu (72 KDa) pour SGLT1 et SGLT2 dans les CEs.

Les études de RT-PCR n'ont pas révélé l'expression des ARNm SGLT2 en conditions basales, le signal étant en dessous de la limite de détection. En revanche, une courte exposition au high glucose ou au peroxyde d'hydrogène a induit l'expression des ARNm SGLT2 dans les CEs. Par contre, le niveau d'expression des ARNm de SGLT1, déjà exprimé en conditions basales, n'a pas varié avec les traitements HG et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour étudier l'expression des ARNm de SGLT1 et SGLT2 en fonction du temps. Cette induction précoce de SGLT2 est à rapprocher de celle du facteur tissulaire, dont le « early responsive gene » est rapidement et transitoirement transcrit dans les premières heures après activation cellulaire. De manière intéressante, l'analyse par Western Blot montre une expression de SGLT2 dans les CEs en conditions basales, cette expression est significativement augmentée par les traitements HG après 4 heures et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> après 1 heure. L'expression de SGLT1 est également augmentée avec ces traitements. Les études de transport du glucose suggèrent que SGLT2 contribue à l'entrée de glucose uniquement dans les CEs exposées au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou au HG, mais pas dans les CEs en condition basales, tandis que le SGLT1 est impliqué dans les deux cas.

La dissociation observée entre la réponse de l'expression des ARNm et des protéines des SGLTs, indique une régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle complexe déjà décrite dans d'autres modèles. En effet, il a été rapporté que la souris ob/ob, un modèle de DT2, avait un faible niveau d'expression des ARNm SGLT1 mais un fort niveau d'expression de la protéine SGLT1 dans le cortex rénal (Gembardt *et al.*, 2014). Une étude déterminant le niveau

d'expression des ARNm de SGLT1 dans l'intestin ovin, a montré que l'injection directe de 1.5 litre par jour de glucose (30 mM) dans la lumière intestinale pendant 4 jours, a augmenté l'ARNm de SGLT1 d'environ 2 fois, et de la protéine et de l'activité de SGLT1 d'environ 60 à 90 fois. L'activité de SGLT1 a été évalué en mesurant l'absorption du glucose dans les BBMV (Brush-Border membrane vesicles) préparées à partir de l'intestin. Ces résultats indiquent une régulation essentiellement post-transcriptionnelle de SGLT1 (Lescale-Matys *et al.*, 1993). Une étude évaluant la régulation de SGLT2 par les androgènes, a montré un niveau d'expression de la protéine SGLT2, trois fois plus élevé dans le rein de rat femelle par rapport au rein de rat mâle, alors que les niveaux d'expression des ARNm étaient similaires (Sabolic *et al.*, 2012). Dans un modèle murin de diabète de type 1 (DT1) induit par la streptozotocine (STZ), une diminution de 60% de l'expression protéique de SGLT2 rénal a été observée par rapport au souris de type sauvage (Vallon *et al.*, 2013). Cette diminution de l'expression de SGLT2 résulte probablement d'un effet direct de la STZ sur le tubule proximal puisque l'expression rénale de SGLT2 est souvent augmentée dans le diabète. En effet, une augmentation du niveau d'expression des ARNm SGLT2 a été montré dans des modèles expérimentaux de DT2 (souris db/db), de DT1 (souris Akita) (Vallon *et al.*, 2014), et une augmentation de l'expression de la protéine SGLT2 accompagnée par une augmentation de l'absorption du glucose, est observée dans les cellules épithéliales tubulaires de patients atteints de DT2 (Rahmoune *et al.*, 2005).

Nos résultats montrent pour la première fois que les CEs sont capables d'exprimer SGLT2 en réponse au stress oxydant induit par le HG, conduisant ainsi à une augmentation de l'entrée de glucose dans les CEs pathologiques et aggravant de ce fait la glucotoxicité. De plus, nous avons observé, *in vivo*, une expression accrue des transporteurs SGLT 1 et SGLT2 dans les zones artérielles à risque (les crosses aortiques) caractérisées par un stress oxydant élevé, une formation réduite de NO, et une sénescence prématurée, dus à l'exposition à un flux sanguin turbulent dans ces zones, comparé à l'aorte thoracique, où le flux est laminaire (Kunieda *et al.*, 2006 ; Warboys *et al.*, 2014).

Aucune étude auparavant n'avait pu révéler la présence de SGLT2 dans les CEs. Han et al ont examiné le niveau d'expression des ARNm de différents isoformes de SGLTs (SGLT1–SGLT6) dans des cultures de CEs et CML d'artères pulmonaires et d'artères coronaires humaines ou de souris. Le SGLT2 n'a pas été détecté dans ces cellules. Par contre, le SGLT1 a été détecté mais avec un niveau d'expression beaucoup plus faible par rapport à celui de l'intestin et du rein. Il est important de noter que les connaissances concernant l'expression de SGLT1 et SGLT2 dans d'autres organes que le rein et l'intestin sont presque exclusivement

basées sur les analyses des niveaux d'expression des ARNm par RT-PCR. Cependant, ces résultats négatifs n'excluent pas l'expression de la protéine SGLT2. Il est possible que de très petites quantités d'ARNm codant pour ces transporteurs n'aient pas pu être détectées dans les lignées cellulaires ou que les conditions expérimentales ou pré analytiques aient favorisé la dégradation des ARNm. De plus, Il est fréquent que certaines lignées de cellules endothéliales humaines perdent l'expression de certaines protéines au fur et à mesure de leur duplication, comme le récepteur AT-1R ou les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine. Contrairement aux investigations précédentes, et pour contrecarrer les obstacles cités ci-dessus, nous avons étudié l'expression génique et protéique de ces transporteurs, à partir de cultures de cellules endothéliales primaires. De plus, nous avons procédé à la purification des ARNm des CEs afin d'augmenter les quantités d'ARNm codant pour les SGLTs. Enfin, des tissus comme le rein et l'intestin ont été utilisés comme contrôles positifs, pour la validation de nos conditions expérimentales.

Le fait que le stress oxydant augmente l'expression de SGLT1 et SGLT2, dans les CEs menant à l'aggravation de la glucotoxicité, est cohérent avec les connaissances actuelles. Le stress oxydant a toujours été considéré comme un élément clé dans la génération des complications vasculaires du diabétique en induisant des dommages directs de l'ADN et des protéines, ou en modulant l'expression de certains gènes redox-sensibles. Il s'avère que les promoteurs du gène *SLC5A1* et *SLC5A2* humain, codant pour SGLT1 et SGLT2 respectivement, présente des sites consensus capable de lier plusieurs membres de la famille de facteurs de transcription Sp redox sensible. La famille Sp1 contient six membres (Sp1 à Sp6) qui sont capables de se lier au promoteur SGLT1 avec la même affinité. Parmi ceux-ci, Sp1, Sp4 et Sp6 sont des activateurs de la transcription de SGLT1 (Martín *et al.*, 2000). L'expression des membres de la famille Sp1 varie selon les tissus et les types cellulaires. Le facteur de transcription Sp1 est exprimé dans les CEs et joue un rôle clé dans la régulation de l'expression de la eNOS en conditions de stress oxydant ou d'hypoxie (Kumar *et al.*, 2009 ; Yang *et al.*, 2014). De nombreux facteurs de transcription interagissent avec Sp1 et modulent son activité, tels que AP1 et NF- $\kappa$ B (Rosmarin *et al.*, 1998), ce qui pourrait activer la transcription de SGLT1 et SGLT2. Or AP1 et NF- $\kappa$ B sont constitutivement activés dans les CEs et CML en conditions HG (Patel *et al.*, 2009). Il a été montré que l'activation redox sensible de NF- $\kappa$ B par l'IL-6, augmente l'expression génique et protéique de SGLT1 et de SGLT2, ainsi que l'absorption d'un analogue de synthèse du glucose, pouvant entrer exclusivement par les SGLTs (alpha-méthyl-d-[(14 C)]glucopyranoside,  $\alpha$ -MG), dans les cellules primaires du tubule proximal rénal (PTC). Le prétraitement des

cellules PTC par un antioxydant (acide ascorbique) ou par des inhibiteurs de NF- $\kappa$ B (BAY 11-7082 ou SN50) a efficacement inhibé l'absorption d' $\alpha$ -MG dans les PTC exposées à l'IL-6 (Lee *et al.*, 2007), indiquant le rôle de l'activation redox sensible de NF- $\kappa$ B dans l'induction de l'expression de SGLT2 par l'IL-6.

Etant donné que NF- $\kappa$ B activé a été détecté chez l'homme au niveau des lésions athérosclérotiques dans les CEs, CML et les macrophages en utilisant un anticorps qui reconnaît le signal de localisation nucléaire de la sous unité p65 de NF- $\kappa$ B (Brand *et al.*, 1996), il serait judicieux d'évaluer l'expression des SGLTs au niveau des plaques d'athérosclérose humaines.

Les données de la littérature indiquent que la modulation de l'expression de SGLT1 et SGLT2 par le stress oxydant et le HG est variable. Contrairement à nos résultats, les études *in vitro* avec les cellules épithéliales de tubule proximal rénal de lapin, ont indiqué que le stress oxydant induit par le HG diminue l'expression et l'activité de SGLT1 et SGLT2 (Han *et al.*, 2005). Les auteurs ont suggéré que l'altération du transporteur induite par le stress oxydant pourrait impliquer l'oxydation de résidus d'acides aminés critiques ou des altérations de l'environnement lipidique de la membrane plasmique, comme indiqué par l'augmentation des taux d'hydroperoxydes lipidiques. Dans des cultures de cellules épithéliales rénales porcines LLC-PK1, une diminution de l'expression de SGLT1 a été observée en réponse au HG, avec cependant pas de diminution du transport de glucose sodium-dépendant (Korn *et al.*, 2001). En revanche, et en accord avec nos résultats, l'exposition des cellules épithéliales rénales humaines au HG augmente l'expression génique et protéique de SGLT1 et SGLT2 (Maldonado-Cervantes *et al.*, 2012). Les niveaux d'expression des ARNm SGLT2 dans les cellules tubulaires récoltées à partir des urines de sujets diabétiques sont augmentés (Rahmoune *et al.*, 2005). Nakamura *et al.* ont montré que l'insuline et le peroxyde d'hydrogène mais pas le HG, ont induit une surexpression des SGLT2 dans les cellules épithéliales rénales, associée à une augmentation de l'entrée du glucose et une génération de ROS. Ces effets étaient prévenus par un prétraitement avec l'antioxydant NAC, suggérant un rôle clé du stress oxydant dans la régulation de l'expression des SGLT2 dans ce modèle. (Nakamura *et al.*, 2015). Cette hétérogénéité de l'expression des SGLTs en réponse au stress oxydant peut-être due aux différentes espèces étudiées (lapin, porc ou homme), modèles expérimentaux (*in vivo* vs *in vitro*), types cellulaires (CEs, cellules épithéliales rénales ou intestinales) et vraisemblablement aussi aux différents niveaux d'expression d'enzymes anti oxydantes et prooxydantes.

Nos résultats décrivent un nouveau mécanisme par lequel le stress oxydant pourrait altérer la fonction vasculaire en conditions hyperglycémiques, en impliquant les SGLTs. En effet, une élévation transitoire de la glycémie pendant les périodes postprandiales, pourrait aggraver, préférentiellement, le stress oxydant, la sénescence et la dysfonction endothéliale dans les zones à risque, du fait de la surexpression des transporteurs SGLT1 et SGLT2 dans ces zones. Ainsi, la présence d'un nombre plus important de SGLT1 et SGLT2 dans les zones à risque, pourrait promouvoir une entrée plus importante de glucose et favoriser la glucotoxicité.

D'autres études en plus de la nôtre, ont montré le rôle des SGLTs dans l'induction du stress oxydant en réponse au glucose. En effet, Balteau *et al.* ont rapporté que l'incubation de cardiomyocytes primaires avec une concentration élevée de glucose (21 mM versus 5 mM) a activé la NADPH oxydase et a entraîné la production de ROS et la mort cellulaire. Cette formation de ROS a été fortement inhibée par l'addition de phlorizine, un inhibiteur mixte de SGLT1/2, suggérant que SGLT1 (SGLT2 n'étant pas exprimé dans le cœur) pourrait contribuer aux dommages des cardiomyocytes causés par le HG, en amplifiant la production de ROS induite par l'hyperglycémie (Balteau *et al.*, 2011). Cette hypothèse est en accord avec l'augmentation des niveaux des ARNm SGLT1 observée dans le cœur de patients atteints de DT2, de patients atteints de cardiomyopathie ischémique ou après implantation d'appareils d'assistance ventriculaire gauche (Banerjee *et al.*, 2009). De ce fait, les SGLTs et en particulier le SGLT1 pourraient être une nouvelle cible pour prévenir la glucotoxicité cardiovasculaire.

Les interactions moléculaires menant à la surexpression du transporteur SGLT2 en réponse au HG dans le diabète ne sont pas caractérisées. Des données récentes de la littérature et celles de l'article 2 suggèrent un rôle majeur du système angiotensine local. En effet, l'Ang II est un puissant facteur pro-oxydant impliqué dans le développement des pathologies CV majeures y compris le DT2 (Li *et al.*, 2003). Nos résultats confirment celles d'autres groupes de recherche (Chen *et al.*, 2014) indiquant que l'Ang II est impliquée dans l'induction de la sénescence endothéliale par le HG, car le blocage du AT-1R ou de l'enzyme de conversion prévient la sénescence endothéliale induite par le HG. L'activation du système angiotensine locale après exposition des CEs au HG a également été rapportée. Chen *et al.* ont montré que la sénescence endothéliale induite par le HG, était accompagnée par une surexpression de l'enzyme de conversion, et du AT-1R de l'Ang II (Chen *et al.*, 2014). De plus, dans un modèle de diabète induit par la streptozotocine chez le rat, le niveau d'expression du AT1R, d'ACE et de l'Ang II est fortement augmenté dans les cellules épithéliales du tubule rénal par rapport à celui des rats contrôles (Moon *et al.*, 2008). L'étude clinique HOPE (Heart Outcomes Prevention Evaluation)

qui a évalué l'effet de l'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (Ramipril vs placebo) sur la morbidité et la mortalité CV chez les patients à haut risque d'événements CV, a montré un bénéfice CV nettement supérieur du Ramipril, dans la population diabétique comparé à celui observé dans la population non diabétique, confirmant l'importance du système angiotensine local dans le diabète. En effet, cette étude a été arrêtée prématurément sur conseils du comité de suivi des données, en raison de preuves précoces convaincantes du bénéfice du traitement par le Ramipril sur le critère primaire composite MACE (14% pour Ramipril vs 17,8% pour placebo) avec une réduction du risque relatif de 32% pour l'AVC, 20% pour l'IDM, 26% pour la mortalité CV et 16% pour la mortalité toutes causes confondues, chez l'ensemble des patients (Sleight *et al.*, 2000). Les résultats du sous-groupe des 3577 sujets diabétiques étaient encore plus frappants, avec une réduction de 25% du critère de jugement primaire composite. Cette réduction, et en particulier la réduction de l'IDM, dépassait de loin ce qui était attendu de la baisse modérée de la pression artérielle. En outre, une analyse de régression multiple du sous-groupe diabétique a montré des réductions de risque relatif similaires, même après ajustement du poids des variations de la PA (Sleight *et al.*, 2000). Ces résultats suggèrent que l'implication du système RAS dans la morbi-mortalité CV est nettement plus importante dans la population diabétique comparée au non diabétique.

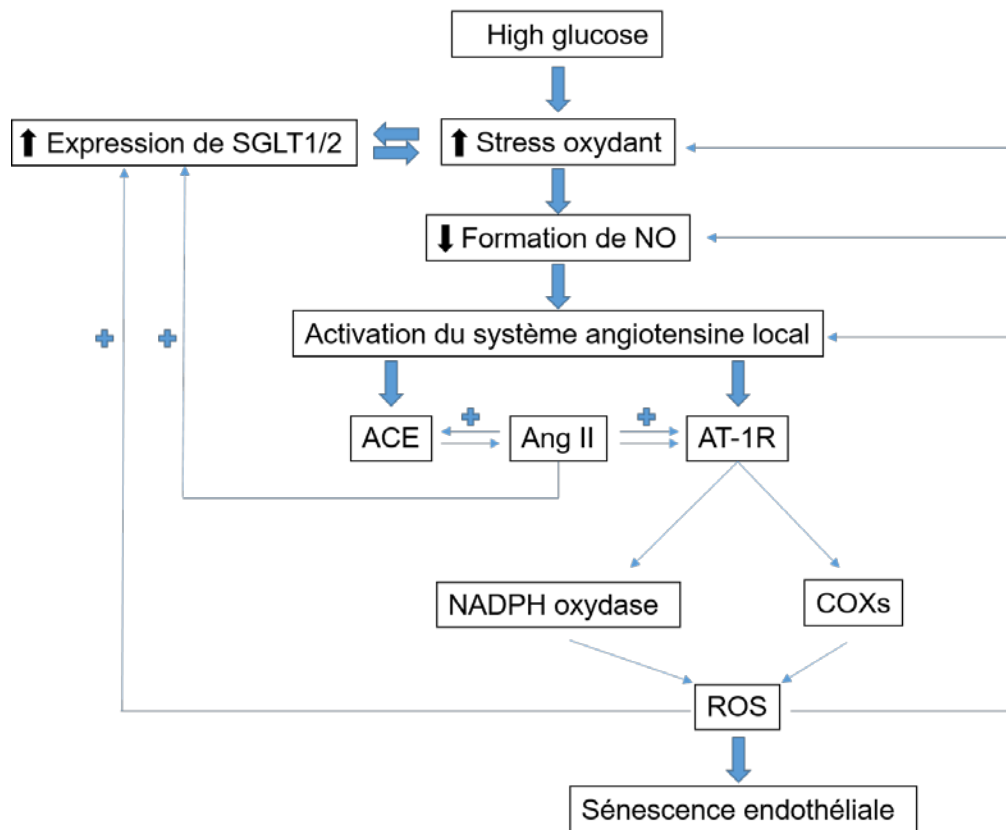
Le fait que l'Empagliflozine prévient l'activation du système angiotensine locale induite par le HG dans notre étude, attire l'attention sur l'implication clinique des inhibiteurs de SGLT2 comme potentiels inhibiteurs de RAS.

Basé sur le fait que les inhibiteurs de SGLT2 ciblent un système différent de celui du RAS, une étude clinique a été réalisée chez des patients atteints de DT2, présentant une résistance thérapeutique individuelle aux inhibiteurs du RAS (IEC ou Sartans) afin de savoir si l'addition d'un inhibiteur de SGLT2, la dapagliflozine, peut surmonter, de par l'effet protecteur CV et rénal des gliflozines, la résistance aux inhibiteurs de RAS. Le critère de jugement étant la réduction de l'albuminurie dans une cohorte de diabétiques avec une insuffisance rénale (eGFR  $\geq 45$  ml/min/1,73m<sup>2</sup>). Cependant, les patients qui n'ont pas répondu aux inhibiteurs de RAS, n'ont pas non plus répondu aux inhibiteurs de SGLT2 (Petrykiv *et al.*, 2017). Les résultats de cette étude sont inattendus et intrigants, compte-tenu des différences dans le mécanisme d'action de l'inhibition du RAS et de SGLT2, et suggèrent peut-être un lien entre la signalisation des SGLT2 et celle du RAS ou l'existence d'un partenaire commun indispensable à l'activité des deux systèmes.



Une seule étude en plus de la nôtre, a montré un lien entre l'Ang II et le transporteur SGLT2. Une augmentation aiguë de la pression artérielle chez les rats normo-tendus induit une réponse natriurétique et diurétique, associée à une diminution de la réabsorption de Na<sup>+</sup> dans le tubule proximal rénal (Chou *et al.*, 1988) tandis que la natriurèse et la diurèse sont réduits chez les animaux hypertendus (SHR) (Roman *et al.*, 1985), suggérant une altération du transport de sodium dans l'hypertension. Bautista et al ont vérifié si des changements dans l'activité des transporteurs du Na<sup>+</sup> étaient impliqués. En effet, ils ont montré que l'absorption du glucose médiée par SGLT2 est augmentée dans les vésicules BBMV (Brush Border Membrane Vesicles) préparées à partir du cortex rénal de rats hypertendus par rapport aux rats normotendus. L'activité accrue du SGLT2 a été associée à une augmentation de l'expression de la protéine et de l'ARNm de SGLT2. La prévention d'une augmentation de la pression artérielle par l'inhibition de la synthèse de l'Ang II avec les IECs ou le blocage du récepteur AT-1 avec les Sartans, a empêché l'augmentation de l'activité et de l'expression du SGLT2 chez les rats hypertendus. Ces données suggèrent que l'augmentation de l'activité Ang II dans des conditions hypertensives entraîne une augmentation de la réabsorption du glucose et du Na<sup>+</sup> en réponse à l'augmentation de l'expression et de l'activité de SGLT2 (Bautista *et al.*, 2004). Ces résultats pourraient expliquer les observations initiales de Parenti et al qui ont rapporté que le transport de glucose dépendant du Na<sup>+</sup> était plus important chez les rats hypertendus de Milan que chez les rats normo-tendus (Parenti *et al.*, 1986) et par Ikari et al qui ont suggéré que l'augmentation du transport du glucose pourrait être liée à l'augmentation de la densité des transporteurs dans le tissu rénal des rats hypertendus (Ikari *et al.*, 2001).

Plus généralement, on pourrait conclure que le SGLT2 favorise une entrée excessive de glucose dans les CEs menant à l'activation redox-sensible du système angiotensine local, et que l'Ang II à son tour, stimulerait l'expression de SGLT2 formant une boucle d'activation menant ultérieurement à la sénescence et à la dysfonction endothéliale.



**Figure 23 : Schéma récapitulant les mécanismes impliqués dans l'induction de la sénescence endothéliale en réponse au HG.**

Les effets bénéfiques de l'Empagliflozine sur la fonction endothéliale, dans l'étude 2, étaient observés avec une concentration de 100 nM. Cette concentration est pertinente d'un point de vue clinique car elle se rapproche des concentrations plasmatiques retrouvées après administration de 25 mg d'Empagliflozine par voie orale (500 nM). Cette concentration est également inférieure à la concentration inhibitrice (CI<sub>50</sub>, 8500 nM) de l'Empagliflozine pour le SGLT1, suggérant que l'effet bénéfique de l'Empagliflozine observé est vraisemblablement via le SGLT2. Il est important de noter que le LX-4211, inhibiteur mixte des SGLT1/2, prévient également la sénescence endothéliale induite par le HG avec un effet supérieur à celui de l'Empagliflozine. Ceci est cohérent étant donné la surexpression de SGLT1 et SGLT2 en conditions HG. De plus, l'effet du LX-4211 est vraisemblablement médié par SGLT1 et SGLT2 car les CI<sub>50</sub> du LX-4211 sont 1,8 nM et 36 nM pour SGLT1 et SGLT2 respectivement, toutes les deux inférieures à la concentration de LX-4211 utilisée (100 nM). La haute sélectivité de l'Empagliflozine pour le SGLT2 versus SGLT1 la différencie des autres gliflozines. Cependant, on ignore si cela contribue à expliquer les effets observés uniquement en réponse à

l'Empagliflozine par rapport aux autres gliflozines, dans les études cliniques. En effet, même si l'on a envie de croire à un effet classe, de nombreuses preuves suggèrent la non-équivalence des gliflozines. Les résultats de l'étude CANVAS réalisée dans le cadre réglementaire pour démontrer l'innocuité CV exigée par les autorités sanitaires européenne et américaine, indiquent que la Canagliflozine, conduit à une réduction significative dans le critère primaire de jugement MACE (26,9 vs 31,5 pour 1000 patients, IC 95%, HR 0,86 ; 0,75-0,97) chez les 10142 patients atteints de DT2 à haut risque CV. Cependant, aucune réduction significative de la mortalité CV (HR 0.87 ; 0,72–1,06) ou de la mortalité toute causes (HR 0.87 : 0,74–1,01) a été observée face à 38% et 32% respectivement obtenus avec Empagliflozine, en plus d'une augmentation significative du risque d'amputation et du risque de fractures osseuses avec Canagliflozine (6,3 vs 3,4% dans le groupe placebo pour 1000 patients, IC 95%, HR 1,97, 1,41 à 2,75) et des résultats rénaux non significatifs. Les résultats de l'étude DECLARE avec la Dapagliflozine sont attendus pour 2019.

Dans ce contexte, nous avons évalué l'effet de différents inhibiteurs de SGLT2 (Canagliflozine, Dapagliflozine, Empagliflozine et LX-4211) sur la sénescence endothéliale induite par le HG et celle induite par passage séquentiel. La senescence induite par le HG a été prévenue par les 4 inhibiteurs avec un effet supérieur du LX-4211. Cependant, à l'exception de l'Empagliflozine, les autres inhibiteurs ont également prévenu la senescence répliquative, et ce en condition normo glucose. Les résultats de l'étude 3 montre une augmentation de l'expression des SGLTs dans les CEs sénescents à P3. Il semble judicieux de faire le rapprochement avec nos résultats de l'étude 2 montrant la surexpression des SGLT1 et 2, *in vivo*, dans les zones artérielles à risque et ce chez des rats non diabétiques. La question de savoir si une entrée plus importante de glucose, du fait de la surexpression des SGLTs contribue à l'induction de la sénescence des CEs à P3 et à celle observée dans les zones artérielles à risque, mérite d'être étudiée. Une autre question est de savoir l'implication du sodium co-transporté par les SGLTs dans le processus de la sénescence. En effet, une augmentation modérée de la concentration de sodium dans les CEs en culture, augmente la rigidité de l'endothélium et diminue la libération de NO, en quelques minutes (Oberleithner *et al.*, 2007). Cette rigidité mécanique peut être physiologiquement pertinente car les modifications de la déformabilité des CEs altèrent la fonction des vaisseaux (Fels *et al.*, 2010). De plus, il a été montré qu'un apport élevé en sel a des effets néfastes sur le système cardiovasculaire, indépendamment de l'augmentation de la pression artérielle (Markandu *et al.*, 2005 ; Lifton *et al.*, 2002).

L'inhibition mixte des transporteurs SGLT1 et 2 pourrait être une approche intéressante. Le LX-4211 est en phase III du développement clinique pour le traitement du DT2. Il induit une diminution de l'HbA1c comparable à celle induite par les gliflozines ainsi qu'une perte de poids. En plus de l'inhibition de la réabsorption tubulaire du glucose médiée par SGLT2 et de l'absorption intestinale médiée par SGLT1, le LX-4211 favorise la sécrétion de GLP-1 par les cellules de l'iléon (Powell *et al.*, 2013). De plus, une diminution significative des niveaux de triglycérides a été observée chez les diabétiques recevant LX-4211, cet effet n'a pas été observé avec les gliflozines mais a été signalé avec les analogues du GLP-1 (White *et al.*, 2003 ; Horton *et al.*, 2010). De ce fait, il semblerait que le LX-4211 pourrait apporter un bénéfice supérieur par l'effet incrétine.

L'ensemble des données de notre deuxième étude, obtenues *in vitro*, nécessitent d'être confirmé *in vivo* sur des modèles d'animaux diabétiques. Le rat Zucker diabetic fatty (ZDF) reproduit assez fidèlement le profil du DT2 humain, à savoir une hyperglycémie associée à plusieurs facteurs de risque CV tels que les dyslipidémies et l'obésité. Le but d'une telle étude serait d'évaluer l'impact d'un traitement par l'inhibiteur le plus sélectif de SGLT2, Empagliflozine, sur les paramètres métaboliques (glycémie, insulino-résistance, profile lipidique et marqueurs inflammatoires), les paramètres cardiaques (épaississement pariétale, ... ) ainsi que les paramètres vasculaires (dysfonction endothéliale, stress oxydant et la sénescence endothéliale) d'une part, puis d'évaluer l'expression des SGLT1/2 dans les vaisseaux diabétiques ZDF versus leur contrôle Lean, d'autre part. Etant donné que la répercussion vasculaire de l'hyperglycémie chez l'homme est plus prononcée dans certains vaisseaux (artères coronariennes, carotidiennes, rénales ou fémorales), il serait judicieux de comparer les différents paramètres vasculaires dans différents lits vasculaires chez le ZDF, et leur modification potentielle par le traitement Empagliflozine.

Il serait également important de faire une analyse comparative de l'expression génique et protéique des transporteurs SGLT1/2 dans différents vaisseaux humains (à partir de segments d'artères mammaires ou rénales issus de la chirurgie) et leur répercussion sur la fonction du vaisseau, ce qui pourrait éclairer le lien entre les différents lits vasculaires et la dysfonction endothéliale associée. Et vérifier l'existence d'un profil particulier des transporteurs de glucose dans les vaisseaux de patients diabétiques versus non diabétiques. De plus, l'analyse

immunohistologique permettra de localiser l'expression de SGLT1/2 au niveau de l'endothélium et/ou du muscle lisse vasculaire.

### **Protection du vieillissement vasculaire par les polyphénols : Rôle des transporteurs SGLTs**

Une relation inverse entre la consommation d'aliments riches en anthocyanines et le développement de maladies cardiovasculaires a été observée dans plusieurs études épidémiologiques. McCullough *et al.* ont récemment observé une relation inverse dépendante de la dose, entre l'apport d'anthocyanines (3,8 à 22,2 mg/jour) et la mortalité par maladie coronarienne, chez 38 180 hommes et 60 289 femmes (McCullough *et al.*, 2012) suggérant que les anthocyanines peuvent influencer le développement et la progression des MCV. Des études expérimentales montrent que les polyphénols améliorent la dysfonction endothéliale associée au diabète (Arrick *et al.*, 2011), mais également celle liée au vieillissement (Idris-Khodja *et al.*, 2012 ; Dal-Ros *et al.*, 2012). Si l'effet bénéfique sur la fonction endothéliale est démontré, les mécanismes par lesquels les polyphénols entrent dans les CEs demeurent mal connus.

Nos derniers résultats montrent que l'extrait de cassis (BCE) riche en anthocyanes a diminué la sénescence endothéliale prématurée induite par le HG, et prévenu la sénescence répllicative induite par passage séquentiel des CEs. Cet effet a été significativement aboli par le LX-4211, inhibiteur mixte de SGLT1 et SGLT2 mais pas par l'inhibiteur des GLUTs, la phloretine, suggérant une contribution propre des transporteurs SGLTs dans l'effet protecteur du BCE.

Nos résultats sur le transport du glucose dans les cellules sénescents (article en préparation) confirment et étendent la première observation d'une implication du SGLT1 dans l'entrée de certains polyphénols dans les CEs par Jin *et al.* montrant que la delphinidine-3-*O*-glucoside, membre de la famille des anthocyanines, est capable d'inhiber l'apoptose et le stress oxydant endothéliaux induits par les LDL oxydés. Les auteurs avaient établi l'implication du SGLT1 par deux méthodes, l'ARN interférence et l'inhibition pharmacologique des SGLTs par la phlorizine, prévenant à la fois l'entrée et l'effet protecteur de la delphinidine-3-*O*-glucoside sur la fonction endothéliale (Jin *et al.*, 2013).

Le travail présenté dans l'article 2 démontrant l'implication des SGLT2 dans la sénescence endothéliale induite par le HG est cohérent avec la prédominance des SGLTs dans le transport de glucose observé dans les cellules P3 comparativement au cellules P1 (article en préparation)

suggérant un rôle des SGLTs dans le transport du glucose en conditions pathologiques (HG ou vieillissement endothélial).

En effet, l'étude du transport de glucose indique un rôle prépondérant des SGLTs dans les CEs sénescents alors que dans les CEs jeunes, les GLUTs seraient les contributeurs majoritaires. Cette observation suggère aussi de possibles modifications du profil d'expression des transporteurs de glucose GLUTs et SGLTs selon le degré de sénescence de l'endothélium. Nos résultats sont en faveur de cette hypothèse avec une augmentation significative de la quantité de l'ARNm et de la protéine SGLT1 dans les CEs sénescents à P3 comparé aux cellules jeunes, associé à une diminution de l'expression de la protéine GLUT1, l'isoforme majoritaire des GLUTs dans les CEs.

De ce fait, la surexpression des SGLTs faciliterait une entrée accrue de certains polyphénols dans les CEs en conditions pathologiques et favoriserait une meilleure protection contre le stress oxydant, la sénescence et la dysfonction endothéliale.

Ces travaux posent la question de la caractérisation des molécules polyphénoliques ciblant les SGLT. L'entrée des polyphénols par les SGLTs, est-elle restreinte aux polyphénols glycosidiques, ou pourrait également concerner les aglycones ?

D'une manière plus générale, ce dernier travail a mis en évidence la surexpression des SGLTs, et leur prépondérance sur les GLUTs, dans un endothélium pathologique. Cette observation fait des SGLTs des cibles pertinentes pour une approche de cytoprotection par certains polyphénols ciblant de manière préférentielle des zones à risque de dysfonction endothéliale. Les anthocyanines ciblant les SGLTs pourraient avoir un intérêt dans la protection vasculaire du diabétique notamment pour retarder la progression de la dysfonction endothéliale. Il serait également intéressant de clarifier si les inhibiteurs des SGLT2, utilisé dans le traitement du diabète, limitent la protection endothéliale par les anthocyanines comme observé avec l'inhibiteur mixte LX-4211.

En conclusion, le développement et la progression des MCV sont lents, et souvent s'étendent sur plusieurs décennies. Les interventions nutritionnelles avec un régime riche en polyphénols vasoprotecteur, pourraient être une approche préventive intéressante.

## **Conclusion générale**

## Conclusion générale

La protection cardiovasculaire du diabétique est un enjeu majeur, étant donné que les MCV sont la première cause de mortalité chez les diabétiques. Nous avons montré un rôle majeur des transporteurs SGLT2 dans l'induction de la sénescence et la dysfonction endothéliale par le HG ainsi que le rôle de l'activation redox sensible du système angiotensine local dans ce processus. L'Empagliflozine, inhibiteur sélectif de SGLT2, a considérablement protégé l'endothélium de la glucotoxicité, ce qui confère à l'Empagliflozine, en plus de son effet glycosurique, un bénéfice non connu à ce jour à savoir la protection de la fonction endothéliale. Cette protection pourrait contribuer à expliquer la protection CV (diminution de 38 % de la mortalité CV) observée dans l'étude EMPA-REG. Notre étude montrant la surexpression des transporteurs SGLT1 et SGLT2 dans les zones artérielle athéro-sensibles, caractérisées par un stress oxydant et une sénescence endothéliale, chez le rat non diabétique, pourrait suggérer un bénéfice des inhibiteurs mixte de SGLT1 et SGLT2 dans la protection vasculaire en conditions normoglycémiques, en diminuant l'entrée excessive du glucose postprandial, ou l'entrée du Sodium également co-transporté par les SGLTs.

En plus des inhibiteurs de SGLT2, les anthocyanines de l'extrait de cassis ont prévenu la sénescence endothéliale, vraisemblablement via un mécanisme SGLTs dépendant. La surexpression de SGLT1 lors de la sénescence, pourrait favoriser un ciblage des zones à risque pour une meilleure protection vasculaire par les polyphénols. Cependant, Il serait intéressant de clarifier si les inhibiteurs des SGLT2, utilisé dans le traitement du diabète, limitent la protection endothéliale par les anthocyanines.



## Références

## Références

- Abdelsaid M, Ma H, Coucha M, Ergul A. Late dual endothelin receptor blockade with bosentan restores impaired cerebrovascular function in diabetes. *Life Sci.* 2014 Nov 24;118(2):263-7.
- Abuissa H, Jones PG, Marso SP, O'Keefe JH Jr. Angiotensin converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers for prevention of type 2 diabetes: A meta-analysis of randomized clinical trials. *J Am Coll Cardiol.* 2005 Sep 6;46.
- Adler AI, Stratton IM, Neil HA, Yudkin JS, Matthews DR, Cull CA, Wright AD, Turner RC, Holman RR. Association of systolic blood pressure with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 36): prospective observational study. *BMJ.* 2000 Aug 12;321(7258):412-9.
- ADVANCE Collaborative Group. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008; 358: 2560-2572
- Aird WC. Spatial and temporal dynamics of the endothelium. *J Thromb Haemost.* 2005 Jul;3(7):1392-406
- Ait-Omar A1, Monteiro-Sepulveda M, Poitou C, Le Gall M, Cotillard A, Gilet J, Garbin K, Houllier A, Château D, Lacombe A, Veyrie N, Hugol D, Tordjman J, Magnan C, Serradas P, Clément K, Leturque A, Brot-Laroche E. GLUT2 accumulation in enterocyte apical and intracellular membranes: a study in morbidly obese human subjects and ob/ob and high fat-fed mice. *Diabetes.* 2011 Oct;60(10):2598-60
- Albert CM, Oh K, Whang W, Manson JE, Chae CU, *et al.* Dietary alpha-linolenic acid intake and risk of sudden cardiac death and coronary heart disease. *Circulation.* 2005; 112: 3232–3238.
- Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barrett JC. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Nov 26;93(24):13742-7.
- Allsopp RC1, Chang E, Kashefi-Aazam M, Rogaev EI, Piatyszek MA, Shay JW, Harley CB. Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo. *Exp Cell Res.* 1995 Sep;220(1):194-200..
- Alves-Lopes R1, Neves KB, Montezano AC, Harvey A, Carneiro FS, Touyz RM, Tostes RC. Internal pudental artery dysfunction in diabetes mellitus is mediated by nox1-derived ros-, nrf2-, and rho kinase-dependent mechanisms. *Hypertension.* 2016 Oct;68(4):1056-64
- Alzaid F, Cheung HM, Preedy VR, Sharp PA. Regulation of glucose transporter expression in human intestinal Caco-2 cells following exposure to an anthocyanin-rich berry extract. *PLoS One.* 2013 Nov 13;8(11):e7893 *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013 Jan 15; 304(2):E117-30.
- Anderson T, Charbonneau F, Title LM, Buithieu J, Rose MS, Conradson H, Hildebrand K, Fung M, Verma S, Lonn EM. Microvascular function predicts cardiovascular events in primary prevention: Long-term results from the firefighters and their endothelium (FATE) study. *Circulation.* 2011; 123(2):163–169.

Arcaro G, Zenere BM, Saggiani F, Zenti MG, Monauni T, Lechi A, Muggeo M, Bonadonna RC. ACE inhibitors improve endothelial function in type 1 diabetic patients with normal arterial pressure and microalbuminuria. *Diabetes Care*. 1999 Sep;22(9):1536-42.

Arenas IA, Xu Y, Lopez-Jaramillo P, Davidge ST. Angiotensin II-induced MMP-2 release from endothelial cells is mediated by TNF-alpha. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004; 286: C779-C784.

Arnal J, Warin L, Michel J. Determinants of aortic cyclic guanosine monophosphate in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase. *J Clin Invest*. 1992; 90: 647 -652.

Arrick DM, Sun H, Patel KP, Mayhan WG. Chronic resveratrol treatment restores vascular responsiveness of cerebral arterioles in type 1 diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;301(3):H696—703.

Artero A.; Tarín, J. J.; Cano, A. The impact of moderate wine consumption on health. *Maturitas* 2015, 80, 3-13. atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2002 Oct;13(5):537-43.

Bachetti T, Comini L, Pasini E, Cargnoni A, Curello S, Ferrari R. Ace-inhibition with quinapril modulates the nitric oxide pathway in normotensive rats. *J Mol Cell Cardiol* . 2001; 33 : 395-403

Baker WL, Smyth LR, Riche DM, Bourret EM, Chamberlin KW, White WB. Effects of sodiumglucose co-transporter 2 inhibitors on blood pressure: a systematic review and meta-analysis. *J Am Soc Hypertens*. 2014;8:262-275 e269.

Banday AA, Lokhandwala M.F. Dopamine receptors and hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2008 Aug;10(4):268-75

Banday AA, Lokhandwala MF.. Oxidative stress-induced renal angiotensin AT1 receptor upregulation causes increased stimulation of sodium transporters and hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008 Sep;295(3):F698-706.

Banerjee SK, McGaffin KR, Pastor-Soler NM, Ahmad F. SGLT1 is a novel cardiac glucose transporter that is perturbed in disease states. *Cardiovasc Res* . 2009 Oct 1; 84 (1): 111-118.

Barton M, Yanagisawa M, Vanhoutte PM, Masaki T. Endothelin XII. *Life Sci*. 2012;91:449-451

Basso N, Paglia N, Stella I, De Cavanagh EM, Ferder L, del Rosario Lores Arnaiz M, Inserra F. Protective effect of the inhibition of the renin-angiotensin system on aging. *Regul Pept*. 2005 Jun 30;128(3):247-52.

Bautista R, Manning R, Martinez F, Avila-Casado Mdel C, Soto V, Medina A, Escalante B. Angiotensin II-dependent increased expression of Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter in hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;286:F127-133.

Baylis C, Mitruka B, Deng A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest* . 1992 ; 90 : 278 à 281.

Bell DS. Do sulfonylurea drugs increase the risk of cardiac events?. *CMAJ* . 2006 17 janvier; 174 (2): 185-186. Doi: 10.1503 / cmaj.051237

Bell DSH. Secretagogues et risque cardiaque. *Endocrinologue* 2004; 14: 33-7.

- Benigni A, Daniela Corna, Zoja C, Sonzogni A, Latini R, Salio M, Conti S, Rottoli D, Longaretti L, Cassis P, Morigi M, Coffman TM, Remuzzi G. Disruption of the Ang II type 1 receptor promotes longevity in mice. *J Clin Invest*. 2009; 119(3):524–530
- Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 37(5): 961-76.
- Bhatt MP, Lim YC, Kim YM, Ha KS: C-peptide activates AMPK $\alpha$  and prevents ROS-mediated mitochondrial fission and endothelial apoptosis in diabetes mellitus. *Diabetes* 2013;66:3851-3862.
- Bhatt SR, Lokhandwala MF, Banday AA. Vascular oxidative stress upregulates angiotensin II type I receptors via mechanisms involving nuclear factor kappa B. *Clin Exp Hypertens*. 2014;36(6):367-73
- Bir SC, Pattillo CB, Pardue S, Kolluru GK, Shen X, Giordano T, *et al*. Nitrite anion therapy protects against chronic ischemic tissue injury in db/db diabetic mice in a no/vegf-dependent manner. *Diabetes*. 2014;63:270-281
- Blaak EE, JM Antoine, D Benton *et al*. Impact of postprandial glycaemia on health and prevention of disease. *Obes Rev* 2012;13, 923–984.
- Blackburn EH. Telomeres and telomerase. *Keio J Med*. 2000 Jun;49(2):59-65.
- Bladier C, Wolvetang EJ, Hutchinson P, de Haan JB et Kola I. Response of a primary human fibroblast cell line to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: senescence-like growth arrest or apoptosis? *Cell Growth Differ* 8 : 589 -598, 1997
- Blagosklonny, M.V. Cell senescence and hypermitogenic arrest. *EMBO Rep*. 2003; 4 (4), 358–362.
- Boyd AE 3e, Aguilar-Bryan L, Nelson DA Molecular mechanisms of action of glyburide on the beta cell. *Am J Med*. 1990 20 août; 89 (2A): 3S-10S; Discussion 51S-53S.
- Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandi R, Knuechel R, Page M *et al*.: Activated transcription factor nuclear factor-B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest*, 1996, 97, 1715–1722.
- Brodsky SV, Gealekman O, Chen J, Zhang F, Togashi N, Crabtree M, Gross SS, Nasjletti A et Goligorsky MS. Prevention and reversal of premature endothelial cell senescence and vasculopathy in obesity-induced diabetes by ebselen. *Circ Res* 94 : 377 -384, 2004 . Epub 2003 Dec 11.
- Brown B, Hall AS. Renin-angiotensin system modulation: The weight of evidence. *Am J Hypertens* 2005; 18: S127 – S133.
- Brüne B, Lapetina EG. Activation of a cytosolic ADP-ribosyltransferase by nitric oxide-generating agents. *J Biol Chem* 1989 ; 264 : 8455-8.
- Bürrig KF. The endothelium of advanced arteriosclerotic plaques in humans. *Arterioscler Thromb*. 1991;11: 1678–1689.

Busse R, Edwards G, Félétou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. Endothelium-dependent hyperpolarization, bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci.* 2002; 23: 374–380

Bussemaker E, Popp R, Fisslthaler B, Larson CM, Fleming I, Busse R, Brandes RP. Aged spontaneously hypertensive rats exhibit a selective loss of EDHF-mediated relaxation in the renal artery. *Hypertension.* 2003; 42, 562–568.

Cao G., HU Muccitelli, C. Sanchez-Moreno, RL Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. *Am J Clin Nutr.* 2001 May;73(5):920-6

Cefalu WT, Leiter LA, Yoon KH, Arias P, Niskanen L, Xie J, Balis DA, Canovatchel W, Meininger G. Efficacy and safety of canagliflozin versus glimepiride in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin (CANTATA-SU): 52 week results from a randomised, double-blind, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet.* 2013 Sep 14;382(9896):941-50.

Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM. Détection non invasive du dysfonctionnement endothélial chez les enfants et les adultes à risque d'athérosclérose. *Lancet.* 1992 ; 340 : 1111 -1115.

Chandra SB1, Mohan S2, Ford BM1, Huang L1, Janardhanan P2, Deo KS1, Cong L1, Muir ER3, Duong TQ4. Targeted overexpression of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells improves cerebrovascular reactivity in Ins2Akita-type-1 diabetic mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016 Jun;36(6):1135-42. doi: 10.1177/0271678X15612098. Epub 2015 Oct 26.

Chen F, Chen B, Xiao FQ, Wu YT, Wang RH, Sun ZW, Fu GS, Mou Y, Tao W, Hu XS, Hu SJ. Autophagy protects against senescence and apoptosis via the RAS-mitochondria in high-glucose-induced endothelial cells. *Cell Physiol Biochem.* 2014;33(4):1058-74. doi: 10.1159/000358676. Epub 2014 Apr 9.

Chen J, Brodsky SV, Goligorsky DM, *et al.* Chen J, Brodsky SV, Goligorsky DM, Hampel DJ, Li H, Gross SS, Goligorsky MS: Glycated collagen I induces premature senescence-like phenotypic changes in endothelial cells. *Circ Res* 90 :2002; 1290 –1298

Chen J, Williams S, Ho S, Loraine H, Hagan D, Whaley JM, Feder JN. Quantitative PCR tissue expression profiling of the human SGLT2 gene and related family members. *Diabetes Ther* 2010;1:57–92

Chen J, Brodsky SV, Goligorsky DM, Hampel DJ, Li H, Gross SS, Goligorsky MS. senescence-like phenotypic changes in endothelial cells. *Circ Res.* 2002 Jun 28;90(12):1290-8

Cherney DZ, Perkins BA, Soleymanlou N, *et al.* The effect of empagliflozin on arterial stiffness and heart rate variability in subjects with uncomplicated type 1 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol* 2014; 13: 28.

Cherney DZ, Perkins BA, Soleymanlou N, Maione M, Lai V, Lee A, Fagan NM, Woerle HJ, Johansen OE, Broedl UC, von Eynatten M. Renal hemodynamic effect of sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in patients with type 1 diabetes mellitus. *Circulation.* 2014; 4;129(5):587-97

Chilton RC, Tikkanen I, Cannon CP, *et al.* Effects of empagliflozin on blood pressure and markers of arterial stiffness and vascular resistance in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes. Diabetes Obes Metab.* 2015 Dec;17(12):1180-93

Chimenti C , Kajstura J, Torella D, Urbanek K, Heleniak H, Colussi C, Di Meglio F, Nadal-Ginard B, Frustaci A, Leri A, Maseri A et Anversa P. Senescence and death of primitive cells and myocytes lead to premature cardiac aging and heart failure. *Circ Res* 93 : 604 -613, 2003 . Epub 2003 Sep

Chonchol M, Shlipak MG, Katz R *et al.* Relation de l'acide urique avec la progression de la maladie rénale. *Am J Kidney Dis.* 2007; 50 (2): 239-247. Doi: 10.1053 / j.ajkd.2007.05.013.

Chou CL and Marsh DJ. Time course of proximal tubule response to acute arterial hypertension in the rat. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 1988; 254: F601-F607

Choussat R, Hittinger L, Barbe F, Maistre G, Carayon A, Crozatier B, Su J. Acute effects of an endothelin-1 receptor antagonist bosentan at different stages of heart failure in conscious dogs *Cardiovasc Res* . 1998; 39 : 580-588.

Cifuentes ME, Rey FE, Carretero OA, Pagano JP. Régulation ascendante de p67 phox et gp91 phox dans les aortas à partir de souris infusées par angiotensine II . *Am J Physiol* . 2000; 279 : H2234 -H2240.

Claybaugh T, Decker S, McCall K, Slyvka Y, Steimle J, Wood A. L-arginine supplementation in type ii diabetic rats preserves renal function and improves insulin sensitivity by altering the Nitric Oxide Pathway *Int J Endocrinol.* 2014;171546

Cleary PA, Orchard TJ, Genuth S, Wong ND, Detrano R, Backlund JY, Zinman B, Jacobson A, Sun W, Lachin JM, Nathan DM; DCCT/EDIC Research Group. The effect of intensive glycemic treatment on coronary artery calcification in type 1 diabetic participants of the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study. *Diabetes.* 2006 Dec;55(12):3556-65.

Clozel M, Kuhn H, Hefti F, Baumgartner H. Endothelial dysfunction and subendothelial monocyte macrophages in hypertension. Effect of angiotensin converting enzyme inhibition. *Hypertension artérielle* . 1991; 18 : 132 -141

Coccheri S. Approaches to prevention of cardiovascular complications and events in diabetes mellitus. *Drugs.* 2007;67(7):997-1026

Cohen RA. The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Prog Cardiovasc Dis.* 1995 Sep-Oct;38(2):105-28

Colhoun HM, Betteridge DJ, Durrington PN, Hitman GA, Neil HA, Livingstone SJ, Thomason MJ, Mackness MI, Charlton-Menys V, Fuller JH; CARDS investigators.. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2004 Aug 21-27;364

Colhoun HM, Betteridge DJ, Durrington PN, Hitman GA, Neil HAW, Livingstone SJ, et coll. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatine Diabetes Study (CARDS): multicentre randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2004; 364: 685-96.

Cooper LT, JP Cooke, Dzau VJ. The vasculopathy of aging *J. Gerontol*, 49;pp. B191-B196, 1994

Corpe CP, Basaleh MM, Affleck J, Gould G, Jess TJ, *et al.* The regulation of GLUT5 and GLUT2 activity in the adaptation of intestinal brush-border fructose transport in diabetes. *Pflugers Arch.* 1996; 432: 192–201

Corti, R.; Flammer, A. J.; Hollenberg, N. K.; Luscher, T. F. Cocoa and cardiovascular health. *Circulation* 2009;119, 1433-1441.

Cosentino F, Eto M, De Paolis P, van der Loo B, Bachschmid M, Ullrich V, Kouroedov A, Delli Gatti C, Joch H, Volpe M, Luscher TF. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation.* 2003; 107 : 1017 à 1023.

Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn ME. Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest.* 1990 juil; 86 (1): 228-34.

Crespy V, Aprikian O, Morand C, Besson C, Manach C, Demigne C, and Remesy C Bioavailability of phloretin and phloridzin in rats. *J Nutr,* 2001; 131, 3227-3230.

Daemen MJ, Lombardi DM, Bosman FT, Schwartz SM. Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. *Circ Res* 1991; 68 : 450-6

Dahlof B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristiansson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolo. *Lancet .* 2002 ; 359 : 995 -1003.

Dal-Ros S, Bronner C, Auger C, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenols improve an established aging-related endothelial dysfunction in the mesenteric artery of middle-aged rats: role of oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;419(2):381-7

Dal-Ros S, Zoll J, Lang AL, Auger C, Keller N, Bronner C. Chronic intake of red wine polyphenols by young rats prevents aging-induced endothelial dysfunction and decline in physical performance: role of NADPH oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;404(2):743—9.

Day AJ1, Gee JM, DuPont MS, Johnson IT, Williamson G. Absorption de la quercétine-3-glucoside et de la quercétine-4'-glucoside dans l'intestin grêle du rat: rôle de la lactase de phlorizine hydrolase et du transporteur de glucose dépendante du sodium *Biochem Pharmacol.* 2003 Apr 1; 65(7):1199-206

De Cavanagh EM, Piotrkowski B, Fraga CG. Concerted action of the rennin–angiotensin system, mitochondria, and antioxidant defenses in aging. *Mol. Aspects Med.* 2004; 25 (1–2), 27–36.

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

Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky J, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc* 4. 2009; 4 (12): 1798-806.

Delattre J. D. Bonnefont-Rousselot, M. Bordas-Fonfrède, M.-C. Jaudon. Diabetes mellitus and oxidative stress. *Annales de Biologie Clinique.* 1999; 57(4):437-44.

Deng Q, Liao R, Wu BL, Sun P. High intensity ras signaling induces premature senescence by activating p38 pathway in primary human fibroblasts. *J Biol Chem*. 2004 Jan 9; 279 (2): 1050-9.

Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2004; 364: 158 685–96.

Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher AM. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ Res*. 1997; 81: 970-976

Dominguez JH , Camp K , Maianu L , Feister H , Garvey WT1994 Molecular adaptations of GLUT1 and GLUT2 in renal proximal tubules of diabetic rats. *Am J Physiol* 1994 Feb; 266(2 Pt 2):F283-90

Donato AJ, I. Eskurza, AE Silver, AS Levy, GL Pierce, PE Gates, DR Seals. Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans: relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor-kappaB *Circ Res*. 2007 Jun 8; 100(11):1659-66

Dubey R, Lüscher T. Nitric oxide inhibits angiotensin II-induced migration of rat aortic smooth muscle cell. Role of cyclic-nucleotides and angiotensinI receptors. *J Clin Invest*. 1995; 96: 141-149.

Duckworth W, Abraira C, Moritz T, Reda D, Emanuele N, Reaven PD, Zieve FJ, Marks J, Davis SN, Hayward R, Warren SR, Goldman S, McCarren M, Vitek ME, Henderson WG, Huang GD; VADT Investigators . Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2009; 360:129-39.

Dulić V, Beney GE, Frebourg G, Drullinger LF, Stein GH Uncoupling between Phenotypic Senescence and Cell Cycle Arrest in Aging p21-Deficient Fibroblasts *Mol Cell Biol*. 2000 Sep;20(18):6741-54.

Duplain H, Burcelin R, Sartori C, Cook S, Egli M, Lepori M, Vollenweider P, Pedrazzini T, Nicod P, Thorens B. Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2001; 104 : 342-345.

DY Li, Zhang YC, Philips MI, Sawamura T, Mehta JL. Upregulation of endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein (LOX-1) in cultured human coronary artery endothelial cells by angiotensin II type 1 receptor activation. *Circ Res*. 1999; 84 : 1043-1049.

Dzau V, Gibbons G. Vascular remodeling mechanisms and implications. *J Cardiovasc Pharmacol* .1993; 21 (suppl 1): S1-S5.

Dzau VJ. Tissue angiotensin and pathophysiology of vascular disease. A unifying hypothesis.*Hypertension*. 2001; 37: 1047–1052

Écosse RS, Madhani M, Chauhan S, Moncada S, Andresen J, Nilsson H, Hobbs AJ, Ahluwalia A. Investigation of vascular responses in endothelial nitric oxide synthase/cyclooxygenase-1 double-knockout mice: key role for endothelium-derived hyperpolarizing factor in the regulation of blood pressure in vivo. *Circulation*. 2005; 111: 796-803.



El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 1993 Nov 19; 75(4):817-25.

Ellinsworth DC, Shukla N, Fleming I, Jeremy JY. Interactions between thromboxane A<sub>2</sub>, thromboxane/prostaglandin (TP) receptors, and endothelium-derived hyperpolarization. *Cardiovasc Res*. 2014; 102: 9-16

Engler MB, Engler MM, Chen CY, Malloy MJ, Browne A, Chiu EY, *et al*. Flavonoid-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentrations in healthy adults. *J Am Coll Nutr* 2004; 23(3):197—204.

Engler RL, Yellon DM Sulfonylurea KATP blockade in type II diabetes and preconditioning in cardiovascular disease. *Time for. Circulation*. 1996 1er novembre; 94 (9): 2297-301

Elfeber K, Köhler A, Lutzenburg M, Osswald C, Galla HJ *et al*. (2004) Localization of the Na<sup>+</sup>-D-glucose cotransporter SGLT1 in the blood-brain barrier. *Histochem Cell Biol* 121(3):201-7..

Erusalimsky. Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology. *J Appl Physiol* (1985). 2009 Jan

Fang J. Bioavailability of anthocyanins. *Drug Metab. Rev.* 2014; 46:508–520. Doi 10.3109/03602532.2014.978080

Faria A, Fernandes I, Mateus N, Calhau C. Bioavailability of anthocyanins. In: Ramawat K.G., Merillon J.M, editors. *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*. Springer; Berlin-Heidelberg, Germany: 2013. pp. 2465–2487.

Feletou M, Huang Y, Vanhoutte PM. Endothelium-mediated control of vascular tone: Cox-1 and cox-2 products. *Br J Pharmacol*. 2011; 164:894-912

Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Where Are We Now? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2006; 26: 1215-1225

Fenton M, Barker S, Kurz DJ, Erusalimsky JD. Cellular senescence after single and repeated balloon catheter denudations of rabbit carotid arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21: 220–226

Ferrannini E, DeFronzo RA. Impact of glucose-lowering drugs on cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Eur Heart J* 2015 ; 36 : 2288 - 2296

Ferrannini E, Mark M, Mayoux E. CV Protection in the EMPA-REG OUTCOME Trial: A "Thrifty Substrate" Hypothesis. 2016; 39 (7): 1108-14.

Ferrannini E, Muscelli E, Frascerra S, Baldi S, Mari A, Heise T, Broedl UC, Woerle HJ. Metabolic response to sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in type 2 diabetic patients. *J Clin Invest* 2014; 124 : 499-508.

Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev*. 2002 15 juin; 16 (12): 1472-87

Freitas HS, Anhe GF, Melo KF, Okamoto MM, Oliveira-Souza M, Bordin S, and Machado. UF Na(+) -glucose transporter-2 messenger ribonucleic acid expression in kidney of diabetic rats

correlates with glycemic levels: involvement of hepatocyte nuclear factor-1alpha expression and activity. *Endocrinology*. 2008 Feb;149(2):717-24. Epub 2007 Oct 25

Frye EB, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins. Advanced glycation end product-dependent increase in imidazolium cross-links in human lens proteins. *J Biol Chem*. 1998;273:18714–18719.

Fukui M, Tanaka M, Senmaru T, Nakanishi M, Mukai J, Ohki M, *et al*. Lox-1 is a novel marker for peripheral artery disease in patients with type 2 diabetes. *Metabolism*. 2013;62:935-938

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of the endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 288:373–376

Gaede P, Vedel P, Larsen N, Jensen GVH, Parving H-H, Pedersen O. Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2003;348:383-393 Steno-2

Gaede Peter, MD, DMSc., Henrik Lund-Andersen, MD, DMSc., Hans-Henrik Parving, MD, DMSc., Et Oluf Pedersen, MD, DMSc Effect of a multifactorial intervention on mortality in type 2 *N Engl J Med* 2008; 358: 580-591 7 février 2008 DOI: 10.1056 / NEJMoa0706245

Gaede PH, Jepsen PV, Larsen JN, Jensen GV, Parving HH, Pedersen OB. The Steno-2 study. Intensive multifactorial intervention reduces the occurrence of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *Ugeskr Laeger*. 2003 Jun 23;165(26):2658-61

Gao Y, Chen Z, Leung SW, Vanhoutte PM. Hypoxic Vasospasm Mediated by cIMP: When Soluble Guanylyl Cyclase Turns Bad. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2015 Jun; 65(6): 545–548.

Gardiner S, Kemp P, Bennett T, Palmer R, Moncada S. Nitric oxide synthase inhibitors cause sustained, but reversible, hypertension and hindquarters vasoconstriction in Brattleboro rats. *Eur J Pharmacol*. 1992 Mar 31;213(3):449-51

Garg U, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *Clin Invest*. 1989 May;83(5):1774-7

Gebremedhin D, Koltai MZ, Pogatsa G, Magyar K, Hadhazy P. Influence of experimental diabetes on the mechanical responses of canine coronary arteries: Role of endothelium. *Cardiovasc Res*. 1988;22:537-544

Gembardt F, Bartaun C, Jarzebska N, Mayoux E, Todorov VT, Hohenstein B, Hugo C. The SGLT2 inhibitor empagliflozin ameliorates early features of diabetic nephropathy in BTBR ob/ob type 2 diabetic mice with and without hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014;307:F317-F325

Geraldes P, King GL (2010) Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res*. 2010 Apr 30;106(8):1319-31

Gerstein HC, Pogue J, Mann JF, Lonn E, Dagenais GR, McQueen M, Yusuf S; HOPE investigators. The relationship between dysglycaemia and cardiovascular and renal risk in diabetic and non-diabetic participants in the HOPE study: a prospective epidemiological analysis. *Diabetologia*. 2005; 48 : 1749-55.

Gilbert RE. Sodium-glucose linked transporter-2 inhibitors: potential for renoprotection beyond blood glucose lowering? *Kidney Int* 2014; 86 : 693-700.

González-Suárez E, Samper E, Ramírez A, Flores JM, Martín-Caballero J, Jorcano JL, Blasco MA. Increased epidermal tumors and increased skin wound healing in transgenic mice overexpressing the catalytic subunit of telomerase, mTERT, in basal keratinocytes *EMBO J*. 2001 Jun 1;20(11):2619-30.

Gorbunova V ,Seluanov A ,Pereira-Smith OM Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis. *J Biol Chem* 277 2002;38540 – 38549

Gorbunova V, Seluanov A, Pereira-Smith OM. Expression of human telomerase (hTERT)

Grempler R, Thomas L, Eckhardt M, Himmelsbach F, Sauer A, Sharp DE, Bakker RA, Mark M, Klein T, Eickelmann P. Empagliflozin, a novel selective sodium glucose cotransporter-2 (SGLT-2) inhibitor: characterisation and comparison with other SGLT-2 inhibitors. *Diabetes Obes Metab* 14: 83–90, 2012

Groop LC. Sulfonylureas dans NIDDM. *Diabetes Care* 1992; 15: 737-54

Guo X, Yang B, Tan J, Jiang J, Li D. Associations of dietary intakes of anthocyanins and berry fruits with risk of type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *EUR J. Clin. Nutr.* 2016; 70 : 1360-1367. Doi: 10.1038 / ejcn.2016.142.

Han HJ, Lee YJ, Park SH, *et al.* High glucose-induced oxidative stress inhibits Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter activity in renal proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;288:F988-F996

Han Y, Cho YE, Ayon R, Guo R, Youssef KD, Pan M, Dai A, Yuan JX, Makino A. SGLT inhibitors attenuate NO-dependent vascular relaxation in the pulmonary artery but not in the coronary artery. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015 Nov 1;309(9):L1027-36

Harrison D, Hua C (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 87:840-844.

Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11(3): 298-300.

Harper J.W, Elledge S J, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, Dobrowolski S, Bai C, Connell-Crowley L, Swindell E. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell.* 1995 Apr;6(4):387-400.

Harris AK, Hutchinson JR, Sachidanandam K, Johnson MH, Dorrance AM, Stepp DW, Fagan SC, Ergul A. Type 2 diabetes causes remodeling of cerebrovasculature via differential regulation of matrix metalloproteinases and collagen synthesis: role of endothelin-1. *Diabetes.* 2005 Sep;54(9):2638-4

Hayashi T, Matsui-Hirai H, Miyazaki-Akita A, Fukatsu A. Endothelial cellular senescence is inhibited by nitric oxide: implications in atherosclerosis associated with menopause and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Nov 7;103(45):17018-23

Hayflick L: Senescence: the good the bad and the dysfunctional la durée de vie in vitro limitée des souches cellulaires diploïdes humaines. *Exp Cell Res* 37 :614 -636, 1965

Heerspink H, Perkins B, Fitchett D, Husain M, Cherney D Sodium glucose cotransporter 2 inhibitors in the treatment of diabetes mellitus cardiovascular and kidney effects, potential mechanisms, and clinical applications. *Circulation* 2016 ;134:752–772.

Heinemeyer T, Wingender E, Reuter I, Hermjakob H, Kel AE, Kel OV, Ignatieva EV, Ananko EA, Podkolodnaya OA, Kolpakov FA, Podkolodny NL, Kolchanov NA. Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res* 1998;26:362–7.

Heise T, Seewaldt-Becker E, Macha S, Hantel S, Pinnetti S, Seman L, Woerle HJ. Safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics following 4 weeks' treatment with empagliflozin once daily in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 15: 613–621, 2013

Heise T, Seman L, Macha S, Jones P, Marquart A, Pinnetti S, Woerle HJ, Dugi K. Safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of multiple rising doses of empagliflozin in patients with type 2 diabetes mellitu. *Diabète Ther* 2013; 4 : 331-345.

Heiss C, Dejam A, Kleinbongard P, Schewe T, Sies H, Kelm M. Vascular effects of cocoa rich in flavan-3-ols. *JAMA* 2003;290(8):10301.

Herbert KE, Mistry Y, Hastings R, Poolman T, Niklason L, Williams B. Angiotensin II-mediated oxidative DNA damage accelerates cellular senescence in cultured human vascular smooth muscle cells via telomere-dependent and independent pathways. *Circ Res.* 2008 1er février; 102 (2): 201-208.

Herney DZ, Perkins BA, Soleymanlou N, Maione M, Lai V, Lee A, Fagan NM, Woerle HJ, Johansen OE, Broedl UC, von Eynatten M.. Renal hemodynamic effect of sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in patients with type 1 diabetes mellitus. *Circulation* 2014; 129 : 587-597.

Herrera MD, Mingorance C, Rodríguez-Rodríguez R, Alvarez de Sotomayor M. Endothelial dysfunction and aging: an update *Res Rev.* 2010; 9 : 142-152.

Hertog M.G, Kromhout D, Aravanis C. Blackburn H, Buzina R, Fidana F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch. Inter. Med.* 1995, 155, 381-386.

Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet* 1993, 342, 1007-1011

Hertog MGL, PCH Hollman , MB Katan , Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Cancer* , 20 1993, p. 21 – 29

Hidalgo Jorge, Stefanie Teuber, Francisco J. Morera, Camila Ojeda, Carlos A. Flores, 2María A. Hidalgo, Lucía Núñez, Carlos Villalobos, and Rafael A. Burgos Delphinidin Reduces Glucose Uptake in Mice Jejunal Tissue and Human Intestinal Cells Lines through FFA1/GPR40. *Int J Mol Sci.* 2017 Apr 5;18(4). pii: E750. doi: 10.3390/ijms18040750.

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. Mécanismes sous-jacents endothéliques Dysfonctionnement du diabète sucré. *Circ Res.* 2001; 88 : E14-22.

- Hirsch JR, Loo DD, Wright EM. Regulation of Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter expression by protein kinases in *Xenopus laevis* oocytes. *Xenopus laevis*. *J Biol Chem*. 1996; 271 : 14740-14746.
- Hoffmann J, Haendeler J, Aicher A, Rössig L, Vasa M, Zeiher AM, Dimmeler S. Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli: important role of nitric oxide. *Circ Res*. 2001; 89 : 709-715.
- Horton E.S., Silberman C., Davis K.L., & Berria R. Weight loss, glycemic control, and changes in cardiovascular biomarkers in patients with type 2 diabetes receiving incretin therapies or insulin in a large cohort database. *Diabetes Care*. 2010;33:1759–1765.
- Hou N, Huang N, Han F, Zhao J, Liu X, Sun X. Protective effects of adiponectin on uncoupling of glomerular VEGF-NO axis in early streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *Int Urol Nephrol*. 2014 Oct;46(10):2045-51
- Hovind P, Rossing P, Johnson RJ, Parving HH. Serum uric acid as a new player in the development of diabetic nephropathy *J Ren Nutr*. 2011; 21 (1): 124-127. Doi: 10.1053 / j.jrn.2010.10.024.
- Howard G, O'Leary DH, Zaccaro D, *et al*. Insulin sensitivity and atherosclerosis. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) Investigators. (IRAS) *Circulation* 1996; 93 : 1809-1817.
- Hsu YC, Lee PH, Lei CC, Ho C, Shih YH, Lin CL. Nitric oxide donors rescue diabetic nephropathy through oxidative-stress-and nitrosative-stress-mediated Wnt signaling pathways. *J Diabetes Investig*. 2015 Jan;6(1):24-34.
- Huang A, Silver AE, Shvenke E, Schopfer DW, Jahangir E, Titas MA, Shpilman A, Menzoian JO, Watkins MT, Raffetto JD, Gibbons G, Woodson J, Shaw PM, Dhadyly M, Eberhardt RT, Keaney JF, Jr, Gokce N, Vita JA. Predictive value of reactive hyperemia for cardiovascular events in patients with peripheral arterial disease undergoing vascular surgery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(10):2113–2119
- Huang P, Chen LC, Leu HB, Ding PY, Chen JW, Wu TC, Lin SJ. Enhanced coronary calcification determined by electron beam CT is strongly related to endothelial dysfunction in patients with suspected coronary artery disease. *Chest*. 2005;128(2):810–815
- Hunt JV, Dean RT, Wolff SP. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem J* 1988 ; 256 : 205-12.
- Hunt JV, Smith CCT, Wolff SP. Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* 1990 ; 39 : 1420-4.
- Ichiki T, Miyazaki R, Kamiharaguchi A, Hashimoto T, Matsuura H, Kitamoto S, Tokunou T, Sunagawa K. Resveratrol attenuates angiotensin II-induced senescence of vascular smooth muscle cells. *Regul Pept*. 2012 Aug 20; 177(1-3):35-39.
- Idris Khodja N, Chataigneau T, Auger C, Schini-Kerth VB. Grape-derived polyphenols improve aging-related endothelial dysfunction in rat mesenteric artery: role of oxidative stress and the angiotensin system. *PLoS One*. 2012;7(2):e32039
- Idris-Khodja N, Auger C, Koch E, Schini-Kerth VB. *Crataegus* special extract WS((R))1442 prevents aging-related endothelial dysfunction. *Phytomedicine* 2012;19(8-9):699-706

Ikari A, Tachihara Y, Kawano K, and Suketa Y. Differential regulation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and the Na<sup>+</sup>-coupled glucose transporter in hypertensive rat kidney. *Biochim Biophys Acta* 1510: 118-124, 2001.

Imanishi T, Hano T, Nishio I. Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress. *J Hypertens*. 2005 Jan; 23(1): 97-104

Imanishi T, Hano T, Nishio I. Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress. *J Hypertens* 2005; 23: 97 – 104.

Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh T, Kakimoto M, Sonoda N, Sato N, Sekiguchi N, Kobayashi K, Sumimoto H, Utsumi H et Nawata H. Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Aug;14;(8 Suppl 3):S227-32

Inoguchi T, Battan R, Handler E, Sportsman JR, Heath W, King GL. Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: Differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Nov 15;89(22):11059-63.

Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*. 2000 Nov;49(11):1939-45

Ishii H, Jirousek MR, Koya D, Takagi C, Xia P, Clermont A, Bursell SE, Kern TS, Ballas LM, Heath WF, Stramm LE, Feener EP, King GL. Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKCbeta inhibitor. *Science New York, N Y*. 1996; 272 : 728-731.

Itahana K, Zou Y, Itahana Y, Martinez JL, Beausejour C, Jacobs JJ, Van Lohuizen M, Band V, Campisi J, Dimri GP. Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Mol Cell Biol* 23(1): 389-401.

*J Diabetes Investig*. 2015 Jan;6(1):24-34

Jeune AR 1, Narita M. SASP reflects senescence. *EMBO Rep*. 2009 Mar; 10 (3): 228-30.

Jin X, Yi L, Chen ML, Chen CY, Chang H, Zhang T, Wang L, Zhu JD, Zhang QY, Mi MT. Delphinidin-3-glucoside protects against oxidized low-density lipoprotein-induced mitochondrial dysfunction in vascular endothelial cells via the sodium-dependent glucose transporter SGLT1. *PLoS One*. 2013 Jul 18;8(7):e68617.

Johnson JA, Majumdar SR, Simpson SH, Toth EL. Decreased mortality associated with the use of metformin compared with sulfonylurea monotherapy in type 2. *Diabetes Care* 2002; 25: 2244-8.

Johnson JA, Simpson SH, Toth EL, Majumdar SR. Reduced cardiovascular morbidity and mortality associated with metformin use in subjects with Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2005; 22: 497-502

Johnston KL, Clifford MN & Morgan LM. Possible role for apple juice phenolic compounds in the acute modification of glucose tolerance and gastrointestinal hormone secretion in humans. *J Sci Food Agric* 82, 1800–1805. 2002

- Johnston K , P Sharp , M Clifford *et al.* Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. . FEBS Lett 579 , 1653 – 1657. 2005
- Kagota S, Yamaguchi Y, Nakamura K, Kunitomo M. Altered endothelium-dependent responsiveness in the aortas and renal arteries of otsuka long-evans tokushima fatty (oletf) rats, a model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Gen Pharmacol. 2000;34:201-209
- Kansui Y, Fujii K, Goto K , Abe I, Iida M. Angiotensin II receptor antagonist improves age-related endothelial dysfunction. J Hypertens. 2002; 20:439–446
- Kant V, Kumar D, Kumar D, Prasad R, Gopal A, Pathak NN, Kumar P3, Tandan SK2.. Topical application of substance p promotes wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. Cytokine. 2015;73:144-155
- Kapahi, P., M. E. Boulton, Kirkwood TB. Positive correlation between mammalian life span and cellular resistance to stress. Free Radic Biol Med. 1999 Mar;26(5-6)
- Karnik SS, Unal H, Kemp JR, Tirupula KC, Eguchi S, Vanderheyden PM, Thomas WG. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIX. Angiotensin receptors: interpreters of pathophysiological angiotensinergic stimuli. Pharmacol Rev. 2015 Oct;67(4):754-819
- Kellett GL, Brot-Laroche E, Mace OJ, Leturque A Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2. Annu Rev Nutr. 28: 35-54. 2008
- Kento Kitada, Daisuke Nakano, Hiroyuki Ohsaki , Hirofumi Hitomi , Tohru Minamino, Junichi Yatabe, Robin Felder, Hirohito Mori, Tsutomu Masaki, Hiroyuki Kobori, Akira Nishiyama. Hyperglycemia causes cellular senescence via a SGLT2- and p21-dependent pathway in proximal tubules in the early stage of diabetic nephropathy. J Complications du diabète. 2014 sept-octobre; 28 (5): 604-611.
- Khaw KT *et al.* Association of hemoglobin A1c with cardiovascular disease and mortality in adults: the European prospective investigation into cancer in Norfolk. Ann Intern Med 2004;141:413-20.
- Khoursandi S, Scharlau D, Herter P, Kuhnen C, Martin D, Kinne RK, Kipp H.. Different modes of sodium-D-glucose cotransporter-mediated D-glucose uptake regulation in Caco-2 cells. Am J Physiol Cell Physiol. 2004 Oct;287(4)
- Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, et al: Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. Autophagy 2012;8:445-544.
- Komoroski B, Vachharajani N, Boulton D, Kornhauser D, Gerald M, Li L, Pfister M. Dapagliflozin, a novel SGLT2 inhibitor, induces dose-dependent glucosuria in healthy subjects. Clin Pharmacol Ther 85: 520–526, 2009
- Komoroski B, Vachharajani N, Feng Y, *et al.* Dapagliflozin, a novel, selective SGLT2 inhibitor, improved glycemic control over 2 weeks in patients with type 2 diabetes mellitus. Clin Pharmacol Ther 2009; 85 : 513-519.
- Korn T, Kuhlkamp T, Track C, *et al.* The plasma membrane-associated protein RS1 decreases transcription of the transporter SGLT1 in confluent LLC-PK1 cells. J Biol Chem 2001;276:45330-40

Kossmann S, Hu H, Steven S, Schönfelder T, Fraccarollo D, Mikhed Y, Brähler M, Knorr M, Brandt M, Karbach SH. Inflammatory monocytes determine endothelial nitric-oxide synthase uncoupling and nitro-oxidative stress induced by angiotensin II. *J Biol Chem* . 2014; 289 : 27540-27550.

Kowluru RA, Kowluru A, Veluthakal R, Mohammad G, Syed I, Santos JM, *et al.* IAM1-RAC1 signalling axis-mediated activation of NADPH oxidase-2 initiates mitochondrial damage in the development of diabetic retinopathy. *Diabetologia*. 2014 May;57(5):1047-56

Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, Aarden LA, Mooi WJ, Peeper DS. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*. 2008 Jun 13;133(6):1019-31

Kunieda T, Minamino T, Nishi J, Tateno K, Oyama T, Katsuno T, Miyauchi H, Orimo M, Okada S, Takamura M, Nagai T, Kaneko S, Komuro I.. Angiotensin II induces premature senescence of vascular smooth muscle cells and accelerates the development of atherosclerosis via a p21-dependent pathway. *Circulation*, 2006; 114 (9), 953–960.

Kurz DJ , Decary S, Hong Y, Trivier E, Akhmedov A et Erusalimsky JD. Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells . *J Cell Sci* 117 : 2417 -2426, 2004 .

Lakatta E.G, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: part II: the aging heart in health: links to heart disease. *Circulation*. 2003 Jan 21;107(2):346-54.

Lakatta EG. Age-associated cardiovascular changes in health: impact on cardiovascular disease in older persons. *Heart Fail Rev*. 2002 Jan;7(1):29-49

Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, Harrison DG, Hornig B, Drexler H. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation*. 2002 Dec 10;106(24):3073-8.

Lavoie JL, Sigmund CD. Minireview: overview of the reninangiotensin system – an endocrine and paracrine system. *Endocrinology* 2003; 144 : 2179-83.

Leguina-Ruzzi A, Pereira J, Pereira-Flores K, Valderas JP, Mezzano D, Velarde V, Mezzano D1, Velarde V3, Sáez CG1.. Increased rhoa/rho-kinase activity and markers of endothelial dysfunction in young adult subjects with metabolic syndrome. *Metab Syndr Relat Disord*. 2015;13:373-380

Lei S, Li H, Xu J, Liu Y, Gao X, Wang J, Ng KF, Lau WB, Ma XL, Rodrigues B, Irwin MG, Xia Z. Hyperglycemia-induced protein kinase c beta2 activation induces diastolic cardiac dysfunction in diabetic rats by impairing caveolin-3 expression and akt/enos signaling. *Diabetes*. 2013 Jul;62(7):2318-28

Leibowitz G, Cerasi E Sulphonylurea treatment of NIDDM patients with cardiovascular disease: a mixed blessing? *Diabetologia*. 1996 mai; 39 (5): 503-14.

Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis . *N Engl J Med* . 1991; 325 : 997-1001.



- Lescale-Matys L, Dyer J, Scott D, Freeman TC, Wright EM, Shirazi-Beechey SP. Regulation of the ovine intestinal Na<sup>+</sup>/glucose co-transporter (SGLT1) is dissociated from mRNA abundance. *Biochem J* 291:435–440. 1993)
- Levy BI, Benessiano J, Henrion D, Caputo L, Heymes C, Duriez M, Poitevin P, Samuel JL. Chronic blockade of AT2-subtype receptors prevents the effect of angiotensin II on the rat vascular structure.. *J Clin Invest* . 1996; 98 : 418-425.
- Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol*. 1992 Jun 20;225(4).
- Li D Saldeen T Romeo F Mehta JL . Oxidized LDL upregulates angiotensin II type 1 receptor expression in cultured human coronary artery endothelial cells: the potential role of transcription factor NF-kappaB. *Circulation* . 2000;102:1970–1976. doi:10.1161/01.CIR.102.16.1970
- Li J, Wang JJ, Zhang SX. NADPH oxidase 4-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promotes aberrant retinal neovascularization via activation of VEGF receptor 2 pathway in oxygen-induced retinopathy. *J Diabetes Res*. 2015;2015:963289.
- Li S, Crothers J, Haqq CM, Blackburn EH. Cellular and Gene Expression Responses Involved in the Rapid Growth Inhibition of Human Cancer Cells by RNA Interference-mediated Depletion of Telomerase RNA. *J Biol Chem*. 2005 Jun 24;280(25):23709-1
- Liakos A, Karagiannis T, Athanasiadou E, Sarigianni M, Mainou M, Papatheodorou K, Bekiari E, Tsapas A. Efficacy and safety of empagliflozin for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Obes Metab*. 2014 Oct;16(10):984-93
- Lind L, Berglund L, Larsson A, Sundström J. Endothelial function in resistance and conduit arteries and 5-year risk of cardiovascular disease. *Circulation*. 2011;123(14):1545–1551.
- Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation*. 2007 Jan 30;115(4):459-67.
- 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.
- Lüscher TF, Vanhoutte PM. L'endothélium: modulateur de la fonction cardiovasculaire . Boca Raton, Fla: CRC Press; 1990: 1-255.
- Maeda S, Matsui T, Takeuchi M, Yamagishi S. Sodium-glucose cotransporter 2-mediated oxidative stress augments advanced glycation end products-induced tubular cell apoptosis. *Diabetes Metab Res Rev* 2013; 29: 406–412
- Maldonado-Cervantes & O. G. Galicia & B. Moreno-Jaime & J. R. Zapata-Morales & A. Montoya- Contreras & R. Bautista-Perez & F. Martinez-Morales Autocrine modulation of glucose transporter SGLT2 by IL-6 and TNF- $\alpha$  in LLC-PK1 cells *J Physiol Biochem* (2012) 68:411–420 DOI 10.1007/s13105-012-0153-3
- Malhotra Ricky, Junichi Sadoshima, Frank C. Brosius, Seigo Izumo Mechanical Stretch and Angiotensin II Differentially Upregulate the Renin-Angiotensin System in Cardiac Myocytes In Vitro. *Circulation Research*. 1999;85:137-146

- Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, Sonenberg N. mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene* 25(48): 6416-6422.
- Manzano S, Williamson G. Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells *Mol Nutr Food Res*. 2010 Dec;54(12):1773-80
- Mao Z, Ke Z, Gorbunova V, Seluanov A.. Replicatively senescent cells are arrested in G1 and G2 phases. *Aging (Albany NY)* 2012; 4:431-5; PMID: 22745179
- Margolskee RF, Dyer J, Kokrashvili Z, Salmon KS, Ilegems E, Daly K, Maillet EL, Ninomiya Y, Mosinger B, Shirazi-Beechey SP. T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Sep 18;104(38):15075-80
- Marijic J, Li Q, Song M, Nishimaru K, Stefani E, Toro L. Decreased expression of voltage- and Ca(2+)-activated K(+) channels in coronary smooth muscle during aging. *Circ Res* . 2001; 88 : 210-216
- Marin-Penalver JJ, Martin-Timon I., Sevillano-Collantes C., Del Canizo-Gomez FJ. Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus. . *World J. Diabetes*. 2016; 7 : 354-395. Doi: 10.4239 / wjd.v7.i17.354.
- Marshall, CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*. 1995 Jan 27;80(2):179-85
- Marso SP, Daniels GH, Brown-Frandsen K, Kristensen P, Mann JF, Nauck MA, Nissen SE, Pocock S, Poulter NR, Ravn LS, Steinberg WM, Stockner M, Zinman B, Bergenstal RM, Buse JB; LEADER Steering Committee; LEADER Trial Investigators. Liraglutide and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2016 ; 375 : 311-22.
- Martín G. Martín, Jiafang Wang, R. Sergio Solorzano-Vargas, Jason T. Lam, Eric Turk, Ernest M. Wright Regulation of the human Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter gene, SGLT1, by HNF-1 and Sp1 *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* Published 1 April 2000 Vol. 278 no. 4, G591-G603.
- Martin S., Andriambelosen E., Takeda K., Andriantsitohaina R. Red wine polyphenols increase calcium in bovine aortic endothelial cells: a basis to elucidate signalling pathways leading to nitric oxide production. *Fr. J. Pharmacol*. 2002; 135 : 1579-1587. Doi: 10.1038 / sj.bjp.0704603.
- Matsumoto H, Inaba H, Kishi M , Tominaga S, Hirayama H , Tsuda. Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms. *J Agric Food Chem*. 2001 Mar;49(3):1546-51.
- Matsumoto K, Morishita R, Tomita N, Moriguchi A, Yamasaki K, Aoki M. Impaired endothelial dysfunction in diabetes mellitus rats was restored by oral administration of prostaglandin i2 analogue. *J Endocrinol*. 2002;175:217-223
- Matsumoto S, Shimabukuro M, Fukuda D, Soeki T, Yamakawa K, Masuzaki H, Sata M. Azilsartan, an angiotensin ii type 1 receptor blocker, restores endothelial function by reducing vascular inflammation and by increasing the phosphorylation ratio ser(1177)/thr(497) of endothelial nitric oxide synthase in diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol*. 2014;13:30

- Matsushita H, Chang E, Glassford AJ, Cooke JP, Chiu CP, Tsao PS. eNOS activity is reduced in senescent human endothelial cells: preservation by hTERT immortalization. *Circ Res*. 2001; 89: 793–798.
- Matsuzawa Y, Kwon TG, Lennon RJ, Lerman LO, Lerman A. Prognostic Value of Flow-Mediated Vasodilation in Brachial Artery and Fingertip Artery for Cardiovascular Events: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Heart Assoc*. 2015; 4 (11): e002270.
- 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 : 11-18.
- McEachern MJ, Krauskopf A, Blackburn EH. Telomeres and their control. *Annu*
- Meinert CL, Knatterud GL, Prout TE *et al*. A study of the effects of hypoglycemic agents on vascular complications in patients with adult-onset diabetes. II. Mortality. *Diabète*1970; 19 (Suppl): 789-830.
- Mellbin LG, Rydén L, *et al*. Does hypoglycaemia increase the risk of cardiovascular events? A report from the ORIGIN trial. *Eur Heart J* 2013; 34: 3137–3144.
- Mellion BT, Ignarro LJ, Ohlstein EH, Pontecorvo EG, Hyman AL, Kadowitz PJ. Inhibition of human platelet aggregation by S-nitrosothiols. Heme-dependent activation of soluble guanylate cyclase and stimulation of cyclic GMP accumulation. *Mol Pharmacol* 1983 ; 23 : 653-64.
- Merovci A, Solis-Herrera C, Daniele G, *et al*. Dapagliflozin improves muscle insulin sensitivity but enhances endogenous glucose production. *J Clin Invest* 2014; 124 : 509-514.
- Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, Majoor DM, Shay JW, Mooi WJ, Peepers DS.. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 2005; 436:720-4; PMID:16079850
- Mike J. Sampson , MD 1 ,Mark S. Winterbone , BSC 2 ,Jackie C. Hughes , BSC 2 ,Nicoletta Dozio , PHD 1 etDavid A. Hughes. Monocyte Telomere Shortening and Oxidative DNA Damage in Type 2 Diabetes *Diabetes Care* 2006 Feb; 29 (2): 283 - 289.
- Minamino T , Miyauchi H , Yoshida T , Ishida Y , Yoshida H , Komuro I . Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation*. 2002 Apr 2;105(13)
- Minamino T 1 , Miyauchi H , Yoshida T , Tateno K , Komuro I . The role of vascular cell senescence in atherosclerosis: antisenescence as a novel therapeutic strategy for vascular aging. *Curr Vasc Pharmacol*. 2004 Apr;2(2):141-8
- Minamino T, Komuro I. Role of telomere in endothelial dysfunction in
- Miquel J, An update of the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: genetic and evolutionary implications. *Exp Gerontol*. 1998 Jan-Mar;33(1-2):113-26
- Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*. 1995 Jan 27;80(2):293-9.

Miyazawa T, Nakagawa K, Kudo M, Muraishi K, Someya K. Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. *J Agric Food Chem.* 1999 Mar;47(3):1083-91.

Modrick M.L, Didion SP, Sigmund CD, Faraci FM. Role of oxidative stress and AT1 receptors in cerebral vascular dysfunction with aging. *American Journal of Physiology*, 2009,296:1914-1919

Mogensen CE. Maximum tubular reabsorption capacity for glucose and renal hemodynamicis during rapid hypertonic glucose infusion in normal and diabetic subjects. *Scand J Clin Lab Invest* 1971; 28 : 101-109.

Monahan KD, Feehan RP, Kunselman AR, Preston AG, Miller DL, Lott ME. Dose-dependent increases in flow-mediated dilation following acute cocoa ingestion in healthy older adults. *J*

Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A2 and prostacyclin. *Pharmacol Rev.* 1979; 30:293–331

Monnier L, Thuan J-F. Type 1 diabetes of the child and the adult. Type 2 diabetes of

Mu X He K Sun H et al Hydrogen peroxide induces overexpression of angiotensin-converting enzyme in human umbilical vein endothelial cells. *Free Radic Res .* 2013;47:116–122. doi:10.3109/10715762.2012.749987

Mudaliar S ,Polidori D ,Zambrowicz B ,Henry RR. Sodium-Glucose Cotransporter Inhibitors: Effects on Renal and Intestinal Glucose Transport: From Bench to Bedside. *Diabetes Care* 2015 ; 38 : 2344 – 2353.

Mukai Y, Shimokawa H, Higashi M, Morikawa K, Matoba T, Hiroki J, Kunihiro I, Talukder HM, Takeshita A. Inhibition of renin-angiotensin system ameliorates endothelial dysfunction associated with aging in rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol .* 2002 ; 22 : 1445 -1450.

Muraki I, F Imamura , JE Manson, Hu FB, Willett WC, van Dam RM, Sun Q. Fruit consumption and risk of type 2 diabetes: results from three prospective longitudinal cohort studies. *BMJ.* 2013 Aug 28;347:f5001.

Nagareddy PR, Murphy AJ, Stirzaker RA, Hu Y, Yu S, Miller RG, Ramkhelawon B, Distel E, Westerterp M, Huang LS, Schmidt AM, Orchard TJ, Fisher EA, Tall AR, Goldberg IJ.. Hyperglycaemia promotes myelopoiesis and impairs the resolution of atherosclerosis. *Cell Metabolism* 2013; 17: 695–708

Najjar SS, Scuteri A, Lakatta EG. Arterial aging: is it an immutable cardiovascular risk factor ? *Hypertension artérielle .*2005 ; 46 : 454 -462.

Nakamura N, Matsui T, Ishibashi Y, Yamagishi S. Insulin stimulates SGLT2-mediated tubular glucose absorption via oxidative stress generation . *Diabetol Metab Syndr.* 2015 May 24;7:48.

Narita M 1 , Nñez S , Heard E , Narita M , Lin AW , Hearn SA , Spector DL , Hannon GJ , Lowe SW. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell.* 2003 13 juin; 113 (6).

Nathan DM, Genuth S, Lachin J, Cleary P, Crofford O, Davis M, Rand L, Siebert C. Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes

on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1993 Sep 30;329(14):977-86.

Navarro-Gonzalez JF, Fernandez-Navarro CM The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 19:433–442. 2008

NAVIGATOR Study Group, McMurray JJ, Holman RR, Haffner SM, Bethel MA, Holzhauer B. Effect of valsartan on the incidence of diabetes and cardiovascular events. *N Engl J Med* 2010;362: 1477–90.

Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* 2002;109 : 1417-27.

Nickenig G, Strehlow K, Roeling J, Zolk O, Knorr A, Böhm M. Salt induces vascular AT1 receptor overexpression in vitro and in vivo. *Hypertension.* 1998 Jun;31(6):1272-7

Nielsen Søren, Jørgen Frøkiær , David Marples , Tae-Hwan Kwon , Peter Agre , Mark A. Knepper Aquaporines dans le rein: des molécules à la médecine Examens physiologiques publiés le 1 janvier 2002 Vol. 82 no. 1,205-244 DOI: 10.1152 / physrev.00024.2001

Nishio K, Inoue A, Qiao S, Kondo H, Mimura A. Senescence and cytoskeleton: overproduction of vimentin induces senescent-like morphology in human fibroblasts. *Histochem Cell Biol.* 2001 Oct; 116 (4): 321-7

Nishizaki T and Matsuoka T. Low glucose enhances Na<sup>+</sup>/glucose transport in bovine brain artery endothelial cells. *Stroke* 29 844-849. nitric oxide pathway. *Int J Endocrinol.* 2014;2014:171546

Noonan WT , Shapiro VM , Banques RO. Renal glucose reabsorption during hypertonic glucose infusion in female streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* 2001 May 18;68(26):2967-77.

Oberleithner H, Riethmüller C, Schillers H, MacGregor GA, de Wardener HE, Hausberg M. Plasma sodium stiffens vascular endothelium and reduces nitric oxide release. *Proc Natl Acad Sci US A.* 2007 Oct 9; 104 (41): 16281-6.

Ohishi Mitsuru, Gregory J Disting, Paul A Fennessy, Frederick AO Mendelsohn, Xiao C Li, and Jia L Zhuo. Increased expression and co-localization of ACE, angiotensin II AT1 receptors and inducible nitric oxide synthase in atherosclerotic human coronary arteries. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2010; 2(2): 111–124.

Ojima A, Matsui T, Nishino Y, Nakamura N, Yamagishi S. Empagliflozin, an Inhibitor of Sodium-Glucose Cotransporter 2 Exerts Anti-Inflammatory and Antifibrotic Effects on Experimental Diabetic Nephropathy Partly by Suppressing AGEs-Receptor Axis. *Horm Metab Res.* 2015; Doi: 10.1055 / s-0034-1395609.

Olde Engberink RH ,Frenkel WJ ,Van den Bogaard B ,Brewster LM ,Vogt L ,Van den Born BJ. Effects of thiazide-type and thiazide-like diuretics on cardiovascular events and mortality: systematic review and meta-analysis. *Hypertension* 2015 ; 65 : 1033 - 1040 pmid: 25733241

Oliveira DM, Freitas HS, Souza MF, Arçari DP, Ribeiro ML, Carvalho PO, Bastos DH. Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) aqueous extract decreases intestinal SGLT1 gene expression but

- does not affect other biochemical parameters in alloxan-diabetic Wistar rats J Agric Food Chem. 2008 Nov 26;56(22):10527-32
- Omae T, Nagaoka T, Tanano I, Yoshida A. Adiponectin-induced dilation of isolated porcine retinal. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013 Jul 10;54(7):4586-9
- Osorio H, Coronel I, Arellano A, Pacheco U, Bautista R, Franco M, Escalante B. Sodium-glucose cotransporter inhibition prevents oxidative stress in the kidney of diabetic rats. Oxid Med Cell Longev 2012; 2012: 542042.
- Panchapakesan U, Pegg K, Gross S, Komala MG, Mudaliar H, Forbes J, Pollock C, Mather A. Effects of SGLT2 inhibition in human kidney proximal tubular cells – renoprotection in diabetic nephropathy? PLoS One 2013; 8: e54442
- Paneni F, Costantino S, Castello L, Battista R, Capretti G, Chiandotto S, *et al.* Targeting prolyl isomerase pin1 prevents mitochondrial oxidative stress and vascular dysfunction: Insights in patients with diabetes. Eur Heart J. 2015;36:817-828
- Panza JA. Endothelial dysfunction in essential hypertension. Clin Cardiol. 1997 Nov;20(11 Suppl 2):II-26-33
- Panza JA. Endothelial dysfunction in essential hypertension. Clin Cardiol. 1997 20 (Suppl 2) 33-40.
- Parenti P, Hanozet GM, and Bianchi G. Sodium and glucose transport across renal brush border membranes of Milan hypertensive rats. Hypertension. 1986 Oct;8(10):932-9.
- Parry D, Bates S, Mann DJ, Peters G. Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16INK4/MTS1 tumour suppressor gene product. EMBO J. 1995 Feb 1;14(3):503-11.
- Patel A, Chalmers J, Poulter N. ADVANCE: Action in diabetes and vascular disease. J Hum Hypertens. 2005;19(Suppl 1):S27–32
- Patel, S. Green tea as a nutraceutical: The latest developments. Food Sci Technol. Res. 2013, 19, 923-932.
- Patrick AW, Hepburn DA, Swainson CP, Frier BM.. Changes in renal function during acute insulin-induced hypoglycaemia in patients with type 1 diabetes. Diabet Med 1992; 9 : 150-155.
- Pechanova O, Bernatova I, Babal P, Martinez MC, Kysela S, Stvrtina S, Andriantsitohaina R.. Red wine polyphenols prevent cardiovascular alterations in L-NAME-induced hypertension.. J Hypertens. 2004 Aug;22(8):1551-9.
- Peng X, Chen R, Wu Y, Huang B, Tang C, Chen J, *et al.* Ppargamma-pi3k/akt-no signal pathway is involved in cardiomyocyte hypertrophy induced by high glucose and insulin. J Diabetes Complications. 2015;29:755-760
- Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroberardino P, Verdecchia P, Schillaci G. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. Circulation. 2001; 104 (2): 191-196.

Petrykiv Sergei, Gozewijn D, Laverman, Dick de Zeeuw, Hiddo J. L. Heerspink. Does SGLT2 inhibition with dapagliflozin overcome individual therapy resistance to RAAS inhibition ?. *Diabetes Obes Metab.* 2017 Jul 7.

Pfeffer MA. ELIXA. Lixisenatide in Patients with Type 2 Diabetes and Acute Coronary Syndrome *N Engl J Med* 2015 ; 373 : 2247-57.

Pinget M, Boullu-Sanchis S. Physiological basis of insulin secretion abnormalities. *Diabetes Metab.* 2002 Dec;28(6 Suppl):4S21-32

Poittevin M, Bonnin P, Pimpie C, Rivière L, Sebrié C, Dohan A1, Pocard M, Charriaut-Marlangue C4, Kubis N5.. Diabetic microangiopathy: impact of impaired cerebral vasoreactivity and delayed angiogenesis after permanent middle cerebral artery occlusion on stroke damage and cerebral repair in mice. *Diabetes.* 2015;64:999-1010

Pontoglio M, Prie ré, Cheret C, Doyen UNE, Leroy C, Froguel P, Velho g, Yaniv M, Friedlander. HNF1alpha controls renal glucose reabsorption in mouse and man. *EMBO Rep.* 2000 Oct;1(4):359-65.

Poppe R, Karbach U, Gambaryan S, Wiesinger H, Lutzenburg M, Kraemer M, Witte OW, Koepsell H. Expression of the Na<sup>+</sup>-D-glucose cotransporter SGLT1 in neurons. *J Neurochem.* 1997 Jul;69(1):84-94

Powell DR, DaCosta CM, Gay J, Ding ZM, Smith M, Greer J, Doree D, JeterJones S, Mseeh F, Rodriguez LA, Harris A, Buhning L, Platt KA, Vogel P, Brommage R, Shadoan MK, Sands AT, Zambrowicz B. Improved glycemic control in mice lacking SglT1 and SglT2. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013; 304: E117–E130

Powell DR, DaCosta CM, Gay J, *et al.* Improved glycemic control in mice lacking SglT1 and SglT2. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013;304:E117-E130

protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis. *J Biol Chem*

Psaty BM, Lumley T, Furberg CD, Schellenbaum G, Pahor M, Alderman MH, Weiss NS. Health outcomes associated with various antihypertensive therapies used as first-line agents: a network meta-analysis. *JAMA* 2003 ; 289 : 2534 - 2544 pmid: 12759325

Radomski M, Palmer R, Moncada S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol .* 1987; 92 :181 -187.

Rafnsson A, Shemyakin A, Pernow J. Selective endothelin eta and dual et(a)/et(b) receptor blockade improve endothelium-dependent vasodilatation in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease. *Life Sci.* 2014;118:435-439

Rahmoune H, Thompson PW, Ward JM, Smith CD, Hong G, Brown J. Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes. *Diabète* 2005; 54 : 3427 à 3434.

Rajagopalan S, Harrison DG. Reversing endothelial dysfunction with ACE inhibitors. A new trend. *Circulation.* 1996 Aug 1;94(3):240-3.

Ramadan M, Mahfouz EM, Goma GF, El-Diasty TA, Alldawi L, Ikrar T, Limin D, Kodama M, Aizawa Y. Evaluation of coronary calcium score by multidetector computed tomography in

relation to endothelial function and inflammatory markers in asymptomatic individuals. *Circ J*. 2008;72(5):778–785.

*Rev Genet* 34: 331-358.

Ridker PM, Gaboury CL, Conlin PR, Seely EW, Williams GH, Vaughan DE. Stimulation of plasminogen activator inhibitor in vivo by infusion of angiotensin II. Evidence of a potential interaction between the renin-angiotensin system and fibrinolytic function. *Circulation* . 1993; 87 : 1969-1973.

Rieg T, Masuda T, Gerasimova M, Mayoux E, Platt K, Powell DR, Thomson SC, Koepsell H, Vallon V.. Increase in SGLT1-mediated transport explains renal glucose reabsorption during genetic and pharmacological SGLT2 inhibition in euglycemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014;306:F188-F193

Rojas A, Morales MA. Advanced glycation and endothelial functions: a link towards vascular complications in diabetes. *Life Sci*. 2004 ;76 : 715 à 730.

Roman RJ and Cowley AW Jr. Abnormal pressure-diuresis-natriuresis response in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 248:F199-F205, 1985

Rosmarin AG, Menglin L, Caprios DG, Shang J, Simkevich CP. Sp1 cooperates with the ets transcription factor, GABP, to activate the CD18 (B2 leukocyte integrin) promoter. *J Biol Chem* 273:13097–13103. 1998

Roy S, Kim D, Hernandez C, Simo R, Roy S. Beneficial effects of fenofibric acid on overexpression of extracellular matrix components, COX-2, and impairment of endothelial permeability associated with diabetic retinopathy. *Exp Eye Res*. 2015 Nov;140:124-129

Rummery NM, Hill CE. Vascular gap junctions and implications for hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* . 2004; 31 : 659-667.

Rury R. Holman, FRCP, Sanjoy K. Paul, Ph.D., M. Angelyn Bethel, MD, David R. Matthews, FRCP et H. Andrew W. Neil, FRCP 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes *N Engl J Med* 2008; 359: 1577-1589 9 octobre 2008 DOI: 10.1056 / NEJMoa0806470

Sachidanandam K, Hutchinson JR, Elgebaly MM, Mezzetti EM, Dorrance AM, Motamed K, Ergul A. Glycemic control prevents microvascular remodeling and increased tone in type 2 diabetes: link to endothelin. *Am J Physiol*. 2009; 296 : R952-R959.

Salas E, Moro MA, Askew S, *et al*. Comparative pharmacology for analogues of S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine in platelets. *Br J Pharmacol* 1994 ; 112 : 1071-6.

Santer R, Calado J. Familial renal glucosuria and SGLT2: from a mendelian trait to a therapeutic target. *Clin J Am Soc Nephrol* 5 : 133-141, 2010

Sarr M, Chataigneau M, Martins S, Schott C, El Bedoui J, Oak MH, Muller B, Chataigneau T, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase. *Cardiovasc Res* 2006;71(4):794-802.

Sato I, Kaji K, Morita I, Nagao M, Murota S. Augmentation of endothelin-1, prostacyclin and thromboxane A2 secretion associated with in vitro ageing in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Mech Ageing Dev*. 1993 Oct 1;71(1-2):73-84



Sato K, Kashiwaya Y, Keon CA, et al. Insulin, ketone bodies, and mitochondrial energy transduction. *FASEB J* 1995;9:651–658

Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C. Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca<sup>2+</sup> sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem*. 2000 Jul 14;275(28):21722-9

Sawada N, Itoh H, Yamashita J. cGMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates RhoA. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Jan 26;280(3):798-805

Scheen AJ. Pharmacodynamics, efficacy and safety of sodium-glucose co-transporter type 2 (SGLT2) inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Drugs*. 2015 Jan;75(1):33-59

Schernthaner G, Schernthaner-Reiter MH, Schernthaner GH. EMPA-REG and Other Cardiovascular Outcome Trials of Glucose-lowering Agents: Implications for Future Treatment Strategies in Type 2 Diabetes Mellitus *Clin Ther*. 2016; 38 (6): 1288-1298. Doi: 10.1016 / j.clinthera.2016.04.037.

Schini-Kerth V. B, Étienne-Selloum N, Chataigneau T, Auger C. Vascular protection by natural product-derived polyphenols: In vitro and in vivo evidence. *Planta Medica* 2011, 77, 1161-1167.

Schmidt AM, Yan SD, Stern DM. The dark side of glucose. *Nat Med* . 1995; 1 : 1002 -1004.

Schmidt AM, Yan SD, 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

Scot H. Simpson , Sumit R. Majumdar, Ross T. Tsuyuki, Dean T. Eurich et Jeffrey A. Johnson. Dose-response relation between sulfonylurea drugs and mortality in type 2 diabetes mellitus: a population-based cohort study. *CMAJ*. 2006 Jan 17;174(2):169-74

Seals DR, Jablonski KL, Donato AJ. Aging and vascular endothelial function in humans. *Clin Sci (Lond)*. May 2011; 120(9): 357–375.

Selvin E, Marinopoulos S, Berkenblit G. Meta-analysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus *Ann Intern Med*. 2004; 141 : 421-31

Sha S, Devineni D, Ghosh A, Polidori D, Chien S, Wexler D, Shalayda K, Demarest K, Rothenberg P. Canagliflozin, a novel inhibitor of sodium glucose co-transporter 2, dose dependently reduces calculated renal threshold for glucose excretion and increases urinary glucose excretion in healthy subjects. *Diabetes Obes Metab* 13: 669–672, 2011

Shan H Guo ré Li X Zhao X Li W Bai X. From autophagy to senescence and apoptosis in Angiotensin II-treated vascular endothelial cells *APMIS* . 2014;122:985-992.

Shan H, Guo D, Li X, Zhao X, Li W, Bai X. From autophagy to senescence and apoptosis in Angiotensin II-treated vascular endothelial cells. *APMIS*. 2014 Oct;122(10):985-92.

Shan, HY, Bai, XJ, Chen, XM, 2008. Apoptosis is involved in the senescence of endothelial cells induced by angiotensin II. *Cell Biol. Int*. 32 (2), 264–270

- Shen B, Ye CL, Ye KH, Liu JJ. Mechanism underlying enhanced endothelium-dependent vasodilatation in thoracic aorta of early stage streptozotocin-induced diabetic mice. *Acta Pharmacol Sin.* 2003;24:422-428
- Shi Y, Vanhoutte PM. Reactive oxygen-derived free radicals are key to the endothelial dysfunction of diabetes. *J Diabetes.* 2009;1:151-162
- Shida T, Nozawa T, Sobajima M, Ithori H, Matsuki A, Inoue H. Fluvastatin-induced reduction of oxidative stress ameliorates diabetic cardiomyopathy in association with improving coronary microvasculature. *Heart Vessels.* 2014;29:532-541
- Shih HB, Lee RJ, Lee AJ, Boyle The aging heart and post-infarction left ventricular remodeling *J. Am. Coll. Cardiol.*, 57 (1) (2011), pp. 9–17
- Simpson SH, Majumdar SR, Tsuyuki RT, Eurich DT, Johnson JA. *CMAJ.* Dose-response relation between sulfonylurea drugs and mortality in type 2 diabetes mellitus: a population-based cohort study. 2006 17 janvier; 174 (2): 169-174.
- Siragusa M1, Fleming I2. The eNOS signalosome and its link to endothelial dysfunction. *Pflugers Arch.* 2016 Jul;468(7):1125-37. doi: 10.1007/s00424-016-1839-0.
- Škrtić M, Yang GK, Perkins BA. Erratum to Characterisation of glomerular haemodynamic responses to SGLT2 inhibition in patients with type 1 diabetes and renal hyperfiltration. *Diabetologia* 2014; 57 : 2599-2602.
- Sleight P . The HOPE Study (Heart Outcomes Prevention Evaluation). *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2000 mars; 1 (1): 18-20.
- Smith AR, Hagen TM. Vascular endothelial dysfunction in aging: loss of Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and partial restoration by (R)-alpha-lipoic acid. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31 : 1447-1449.
- Standl E, Schnell O, Ceriello A. Postprandial hyperglycemia and glycemic variability: should we care? *Diabetes Care* 2011; 34 ( Suppl. 2 ): S120-S127.
- Stein GH, Drullinger LF, Soulard A, Dulić V. Differential. Roles for Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors p21 and p16 in the Mechanisms of Senescence and Differentiation in Human Fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 19(3): 2109-2117.
- Steinberg D, Witztum JL Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? *Circulation.* 2002 Apr 30;105(17):2107-11
- Steven E. Nissen, M.D, and Kathy Wolski, M.P.H. Effect of Rosiglitazone on the Risk of Myocardial Infarction and Death from Cardiovascular Causes *N Engl J Med* 2007; 356:2457-2471 June 14, 2007 DOI: 10.1056/NEJMoa072761
- Stewart DJ, Cernacek P, Costello KB, Rouleau JL. Elevated endothelin-1 in heart failure and loss of normal response to postural change. *Circulation.* 1992; 85 : 510-517
- Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, Langleben D. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med.* 1991; 114 : 464-469.

Stratton IM, Adler AI, Neil HA, *et al.* Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ*. 2000; 321 : 405-12.

Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. La vitamine C améliore la vasodilatation dépendante de l'endothélium en rétablissant l'activité de l'oxyde nitrique dans l'hypertension essentielle. *Circulation*. 1998; 97 : 2222 à 2229

Taddei S, Virdis 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(2):274-9

Tahara A, Kurosaki E, Yokono M, Yamajuku D, Kihara R, Hayashizaki Y, Takasu T, Imamura M, Li Q, Tomiyama H, Kobayashi Y, Noda A, Sasamata M, Shibasaki M. Effects of SGLT2 selective inhibitor ipragliflozin on hyperglycemia, hyperlipidemia, hepatic steatosis, oxidative stress, inflammation, and obesity in type 2 diabetic mice. *Eur J of Pharmacol* 2013; 715: 246–255

Tamarat R, Silvestre JS, Durie M, Levy BI. Angiotensin II angiogenic effect in vivo involves vascular endothelial growth factor- and inflammation-related pathways. *Lab Invest*. 2002; 82 : 747-756

Tan KC, Chow WS, Ai VH, Metz C, Bucala R, Lam KS. Advanced glycation end products and endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Soins du diabète*. 2002 ; 25 : 1055 -1059

Taneva E, Borucki K, Weins L, Makarova R, Schmidt- Lucke C, Westphal S. Early effects on endothelial function of atorvastatin 40 mg twice daily and its withdrawal. *Am J Cardiol*. 2006;97:1002–6.

telomerase expression. *J Biol Chem*. 1999 Sep 10;274(37):26141-8

Testani JM, Chen J ,McCauley BD, Kimmel SE, Shannon RP. Potential effects of aggressive decongestion during the treatment of decompensated heart failure on renal function and survival. *Circulation* 2010 ; 122 : 265 - 272 pmid: 20606118 the adult. Complications of diabetes. *Rev Prat* 2007; 57: 653–64.

Thomson SC, Deng A, Bao D, Satriano J, Blantz RC, Vallon V. Ornithine decarboxylase, kidney size, and the tubular hypothesis of glomerular hyperfiltration in experimental diabetes. *J Clin Invest* 107: 217–224, 2001

Thomson SC, Rieg T, Miracle C, Mansoury H, Whaley J, Vallon V, Singh P. Acute and chronic effects of SGLT2 blockage on glomerular and tubular function in the early diabetic rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012 Jan 1;302(1):R75-83

Tiefenbacher C, Bleeke T, Vahl C, Amann K, Vogt A, Kübler W. Endothelial dysfunction of coronary resistance arteries is improved by tetrahydrobiopterin in atherosclerosis. *Circulation*. 2000; 102 (18): 2172-2179.

Törrönen R , M Kolehmainen , E Sarkkinen Mykkänen H, Niskanen L. Postprandial glucose, insulin, and free fatty acid responses to sucrose consumed with blackcurrants and lingonberries in healthy women. *Am J Clin Nutr* 96 , 527 - 533 . 2012

Touyz RM, Tabet F, Schiffrin EL. Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003;30:860–6

- Triggle CR, Ding H, Anderson TJ, Pannirselvam M. The endothelium in health and disease: A discussion of the contribution of non-nitric oxide endothelium-derived vasoactive mediators to vascular homeostasis in normal vessels and in type ii diabetes. *Mol Cell Biochem.* 2004;263:21-27
- Turk E, Kerner CJ, Lostao MP, Wright EM. Membrane topology of the human Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter SGLT1. *J Biol Chem.* 1996; 271 : 1925-1934
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998; 352:837-53.
- UK Prospective Diabetes Study Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 1998; 352: 854-65.
- Vallon V, Gerasimova M, Rose MA, Masuda T, Satriano J, Mayoux E, Koepsell H, Thomson SC, Rieg T. SGLT2 inhibitor empagliflozin reduces renal growth and albuminuria in proportion to hyperglycemia and prevents glomerular hyperfiltration in diabetic Akita mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014 Jan;306(2):F194-204.
- Vallon V, Richter K, Blantz RC, Thomson S, Osswald H. Glomerular hyperfiltration in experimental diabetes mellitus: potential role of tubular reabsorption. *J Am Soc Nephrol.* 1999 Dec;10(12):2569-76.
- Vallon V, Thomson SC. Renal function in diabetic disease models: the tubular system in the pathophysiology of the diabetic kidney. *Annu Rev Physiol.* 2012;74:351-75.
- Vallon V. The mechanisms and therapeutic potential of SGLT2 inhibitors in diabetes mellitus. *Annu Rev Med* 2015;66:255-70
- Vallon V. The mechanisms and therapeutic potential of SGLT2 inhibitors in diabetes mellitus. *Annu Rev Med.* 2015;66:255-70
- Vallon V. The proximal tubule in the pathophysiology of the diabetic kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011; 300 : R1009-22.
- Vanhoutte P. and Eva H. C. Tang. Endothelium-dependent contractions: when a good guy turns bad! *J Physiol* 586.22 2008; pp 5295–5304
- Vanhoutte PM, Tang EH. Endothelium-dependent contractions: When a good guy turns bad! *J Physiol.* 2008 Nov 15;586(22):5295-304
- Vanhoutte PM, Zhao Y, Xu A, Leung SW. Thirty years of saying no: Sources, fate, actions, and misfortunes of the endothelium-derived vasodilator mediator. *Circ Res.* 2016;119:375-396
- Vanhoutte PM. Vascular physiology: the end of the quest? *Nature.* 1987 Jun 11-17;327(6122):459-60.
- Vasa M, Breitschopf K, Zeiher AM, Dimmeler S: Nitric oxide activates telomerase and delays endothelial cell senescence. *Circ Res* 87 : 540 -542, 2000

Vasilakou D, Karagiannis T, Athanasiadou E, Mainou M, Liakos A, Bekiari E, Sarigianni M, Matthews DR, Tsapas A.. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2013; 159: 262–274.

Vayro S, Wood IS, Dyer J, Shirazi-Beechey SP. Transcriptional regulation of the ovine intestinal Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter SGLT1 gene. *Eur J Biochem*. 2001 Oct;268(20):5460-70

Vaziri H, Oues M.D, Allsopp R.C, Davison T. S, Wu Y, Arrowsmith C. H, Poirier GG, Benchimol S. ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase. 1997; *EMBO J*. 16 : 6018 – 6033

Verbeuren TJ, Jordaens FH, Zonnekeyn LL, Van Hove CE, Coene MC, Herman AG. Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit. *Circ Res*. 1986; Apr;58(4):552-64.

Verzola D, Gandolfo MT, Gaetani G, Ferraris A, Mangerini R, Ferrario F, Villaggio B, Gianiorio F, Tosetti F, Weiss U, Traverso P, Mji M, Deferrari G, Garibotto G Soinscence Accelerated senescence in the kidneys of patients with type 2 diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008 Nov; 295 (5): F1563-73.

Vessieres E, Guihot AL, Toutain B, Maquigneau M, Fassot C, Loufrani L, Henrion D. Cox-2-derived prostanoids and oxidative stress additionally reduce endothelium-mediated relaxation in old type 2 diabetic rats. *PLoS One*. 2013 Jul 9;8(7):e68217.

Voghel G, Thorin-Trescases N, Farhat N, Nguyen A, Villeneuve L, Mamarbachi AM, Fortier A, Perrault LP, Carrier M, Thorin E.. Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by oxidative stress associated with cardiovascular risk factors. *Mech Ageing Dev*. 2007 Nov-Dec;128(11-12):662-71

Voghel G, Thorin-Trescases N, Farhat N, Nguyen A, Villeneuve L, Mamarbachi AM, Fortier A, Perrault LP, Carrier M, Thorin E. Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by oxidative stress associated with cardiovascular risk factors. *Mech Ageing Dev*. 2007 Nov-Dec;128(11-12):662-71

Volker Vallon, Maria Gerasimova, Michael A. Rose, Takahiro Masuda, Joseph Satriano, Eric Mayoux, Hermann Koepsell, Scott C. Thomson, and Timo Rieg. SGLT2 inhibitor empagliflozin reduces renal growth and albuminuria in proportion to hyperglycemia and prevents glomerular hyperfiltration in diabetic Akita mice *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014 Jan 15; 306(2): F194–F204.

Von Lewinski D, Rainer PP, Gasser R, Huber MS, Khafaga M, Wilhelm B, Haas T, Mächler H, Rössl U, Pieske B. Glucose-transporter-mediated positive inotropic effects in human myocardium of diabetic and nondiabetic patients. *Metabolism*. 2010 Jul;59(7):1020-8

Von Zglinicki T, Pilger R, Sitte N. Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radic Biol Med*. 2000 Jan 1;28(1):64-74

Von Zglinicki T, Saretzki G, Döcke W, Lotze C. Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence?. *Cell Res*. 220 : 186 - 193

Vrhovac Ivana Daniela Balen Eror Dirk Klessen Christa Burger Davorka Breljak Ognjen Kraus Nikola RadovićStipe JadrijevićIvan AleksicThorsten WallesChristoph SauvantIvan Sabolić, Hermann Koepsell Localizations of Na(+)-D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2 in

human kidney and of SGLT1 in human small intestine, liver, lung, and heart. *European Journal of Physiology* Septembre 2015, Volume 467, Numéro 9 , pp. 1881-1898

Walgren RA, Lin JT, Kinne RK, Walle T. Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000 Sep;294(3):837-43.

Wallace Taylor C. Anthocyanins in Cardiovascular Disease. *Adv Nutr* vol. 2: 1-7, 2011

Wang G, Li W, Chen Q, Jiang Y, Lu X, Zhao X. Hydrogen sulfide accelerates wound healing in diabetic rats. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8:5097-5104

Wang M, Takagi G, Asai K, Resuello RG, Natividad FF, Vatner DE, *et al.* Aging increases aortic MMP-2 activity and angiotensin II in nonhuman primates. *Hypertension* 2003; 41: 1308 – 1316.

Wang M, Zhang J, Jiang LQ, Spinetti G, Pintus G. Proinflammatory profile within the grossly normal aged human aortic wall. *Hypertension.* 2007 Jul;50(1):219-27

Wang Z, Zou J, Cao K, Hsieh TC, Huang Y, Wu JM. Dealcoholized red wine containing known amounts of resveratrol suppresses atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits without affecting plasma lipid levels. *Int J Mol Med* 2005;16(4):533-40.

Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Bräsen JH, Skatchkov M, Heitzer T, Stasch JP, Griendling KK, Harrison DG. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation .* 1999; 99 : 2027-2033

Watanabe T, Barker TA, Berk en Colombie-Britannique. Angiotensin II and the endothelium: diverse signals and effects. . *Hypertension artérielle .* 2005; 45 : 163-169.

Webley K, Bond JA, Jones CJ, Blaydes JP, Craig A, Hupp T, Wynford-Thomas D. Posttranslational modifications of p53 in replicative senescence overlapping but distinct from those induced by DNA damage. *Mol Cell Biol.* 2000 Apr;20(8):2803-8.

Wedick NM, Pan A, Cassidy A, Rimm EB, Sampson L, Rosner B, Willett W, Hu FB, Sun Q, van Dam RM Dietary flavonoid intakes and risk of type 2 diabetes in US men and women. *Un m. J. Clin. Nutr.* 2012; 95 : 925-933. Doi: 10.3945 / ajcn.111.028894.

Wheeler-Jones CP. (2008) Regulation of endothelial prostacyclin synthesis by protease-activated receptors: mechanisms and significance. *Pharmacol Rep* 60:109–118

White J. Efficacy and safety of incretin based therapies: clinical trial data. *J. Am. Pharm. Assoc.* 2003;49 suppl. 1:S30–S40.

Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol .* 2003; 42 : 1149 -1160.

Winther MP, Kanters E, Kraal G, Hofker MH. NF- $\kappa$ B signaling in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25 :904–914.

Wolffram S., M. Block , P. Ader Quercetin-3-glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine *J Nutr ,* 132, p. 630 – 635. 2002

Woods DI, Parry D, Cherwinski H, Bosch E, Lees E, McMahon M. Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1. *Mol. Cell Biol.* 17 (9), 5598–5611.

Wray DW, Nishiyama SK, Harris RA, Zhao J, McDaniel J, Fjeldstad AS, Witman MA, Ives SJ, Barrett-O'Keefe Z, Richardson RS. Acute reversal of endothelial dysfunction in the elderly after antioxidant consumption. *Hypertension.* 2012; 59(4):818-24

Wright EM, Loo DDF, Hirayama BA Biology of human sodium glucose transporters. *Physiol Rev* 91:733–794. 2011

Wu J, Liang Z, Zhou J, Zhong C, Jiang W, Zhang Y, *et al.* Association of Biomarkers of Inflammation and Endothelial Dysfunction with Fasting and Postload Glucose Metabolism: A Population-Based Prospective Cohort Study Among Inner Mongolians in China. *Can J Diabetes.* 2016 Dec;40(6):509-514

Xia P, Inoguchi T, Kern TS, Engerman RL, Oates PJ, Ito GL. Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes.* 1994; 43 : 1122-1129

Xiong S, Salazar G, San Martin A, Ahmad M, Patrushev N, Hilenski L, Nazarewicz RR, Ma M, Ushio-Fukai M, Alexander RW. PGC-1 alpha serine 570 phosphorylation and GCN5-mediated acetylation by angiotensin II drive catalase down-regulation and vascular hypertrophy. *J Biol Chem.* 2010 ; 285 : 2474 – 2487

Xu T, Bu X, Li H, Zhang M, Wang A, Tong W, Xu T, Sun Y, Zhang Y. population-based prospective cohort study among inner mongolians in china. *Can J Diabetes. Stroke.* 2013 Sep;44(9):2457-61

Yaghini FA, Song CY, Lavrentyev EN, Ghafoor HU, Fang XR, Estes AM, *et al.* Angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell migration and growth are mediated by cytochrome P450 1B1-dependent superoxide generation. *Hypertension.* 2010;55(6):1461–7

Yamagata, K.; Tagami, M. ; Yamori, Y. Dietary polyphenols regulate endothelial function and prevent cardiovascular disease. *Nutrition* 2015, 31, 28-37

Yang J, Chang E, Cherry AM, Bangs CD, Oei Y, Bodnar A, Bronstein A, Chiu CP, Herron GS.. Human endothelial cell life extension by

Yeboah J, Folsom AR, Burke GL, Johnson C, Polak JF, Post W, Lima JA, Crouse JR, Herrington DM. Predictive value of brachial flow-mediated dilation for incident cardiovascular events in a population-based study: The multi-ethnic study of atherosclerosis. *Circulation.* 2009;120(6):502–509

Yokoi T, Fukuo K, Yasuda O, Hotta M, Miyazaki J, Takemura Y, Kawamoto H, Ichijo H, Ogiwara T. Apoptosis signal-regulating kinase 1 mediates cellular senescence induced by high glucose in endothelial cells. *Diabète* 55 : 1660 – 1665. 2006

Youdim KA, A Martin, JA. Joseph Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress *Free Radic Biol Med*, 29 (2000), pp. 51-60

Young EJ, Hill MA, Wiehler WB, Triggle CR, Reid JJ. Reduced EDHF responses and connexin activity in mesenteric arteries from the insulin-resistant obese Zucker rat. *Diabetologia.* 2008; 51 : 872-881.

Yusuf S, Ostergren JB, Gerstein HC, Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB. Effects of candesartan on the development of a new diagnosis of diabetes mellitus in patients with heart failure. *Circulation* 2005; 112: 48 – 53

Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. Erratum apparaît en 2000 le 4 mai; 342 (18): 1376. *N Engl J Med* . 2000 ; 342 : 145 -153

Zambrowicz B, Freiman J, Brown PM, Frazier KS, Turnage A, Bronner J, Ruff D, Shadoan M, Banks P, Mseeh F, Rawlins DB, Goodwin NC, Mabon R, Harrison BA, Wilson A, Sands A, Powell DR. LX4211, a dual SGLT1/SGLT2 inhibitor, improved glycemic control in patients with type 2 diabetes in a randomized, placebo-controlled trial. *Clin Pharmacol Ther* 2012;92:158-69

Zeuthen T, Meinild AK, Loo DD, Wright EM, and Klaerke DA (2001) Isotonic transport by the Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter SGLT1 from humans and rabbit. *J Physiol*, 531, 631-644

Zheng Y , JS Scow , JA Duenes *et al.* Mechanisms of glucose uptake in intestinal cell lines: role of GLUT2. *Chirurgie* 151 , 13 - 25. 2012

Zhou L, Cryan EV, D'Andrea MR, Belkowski S, Conway BR, Demarest KT. Human cardiomyocytes express high level of Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter 1 (SGLT1). *J Cell Biochem* 90:339–346. 2003

Zhu Y, Xia M, Yang Y, Liu F, Li Z, Hao Y, Mi M, Jin T, Ling W. Purified anthocyanin supplementation improves endothelial function via NO-cGMP activation in hypercholesterolemic individuals. *Clinical Chem*. 2011, 57, 1524-1533.

Zou TB, Feng D, Song G, Li HW, Tang HW, Ling WH. The role of sodium-dependent glucose transporter 1 and glucose transporter 2 in the absorption of cyanidin-3-O- $\beta$ -glucoside in Caco-2 cells. *Nutrients*. 2014;6:4165–4177



# Induction de la sénescence endothéliale par le high glucose :

## Rôle des transporteurs SGLT1 et 2

### Résumé

La sénescence endothéliale est une étape précoce menant à la dysfonction endothéliale, laquelle favorise la pathogénèse de maladies cardiovasculaires lors du vieillissement physiologique et, de manière prématurée, chez le sujet diabétique. La première étude indique que le stress oxydant favorise l'induction du système angiotensine local menant à la sénescence et la dysfonction endothéliale dans les cellules endothéliales en culture. La deuxième étude indique que l'expression redox-sensible des co-transporteurs sodium-glucose 2 (SGLT2) entraîne via le système angiotensine la sénescence et la dysfonction endothéliale en réponse au high glucose. De plus, les observations indiquent que l'Empagliflozine, un inhibiteur sélectif de SGLT2, et les anthocyanes du jus de cassis sont capables d'inhiber l'induction de la sénescence endothéliale au glucose. De ce fait, le système angiotensine local et le SGLT2 sont des cibles intéressantes pour retarder le vieillissement vasculaire.

### Résumé en anglais

Endothelial senescence is an early step to endothelial dysfunction, known to favor the development of cardiovascular diseases during ageing, or its accelerated form in diabetes. The first in vitro study shows that the activation of the local angiotensin system is favored by the oxidative stress and leads to endothelial senescence and dysfunction. The second study indicates that endothelial senescence and dysfunction in response to high glucose are driven by the redox-sensitive expression of sodium-glucose co-transporters SGLT-2, via the angiotensin system. Moreover, data also indicate that empagliflozin, a SGLT2 selective inhibitor, and anthocyanins from black-currant juice can inhibit the glucose-induced endothelial senescence. Therefore, the local angiotensin system and SGLT2 are promising targets to stunt vascular ageing.

**Keywords:** Endothelial senescence, endothelial dysfunction, local angiotensin system, glucose co-transporters SGLT-2.