



**HAL**  
open science

# Etude de l'impact physiologique d'une protéine synthétique élastique dérivée de l'élastine comme signal moléculaire correcteur dans les artériopathies liées aux altérations des fibres élastiques

Quentin Boete

## ► To cite this version:

Quentin Boete. Etude de l'impact physiologique d'une protéine synthétique élastique dérivée de l'élastine comme signal moléculaire correcteur dans les artériopathies liées aux altérations des fibres élastiques. *Physiologie [q-bio.TO]*. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. NNT : 2022GRALV084 . tel-04061849

**HAL Id: tel-04061849**

**<https://theses.hal.science/tel-04061849>**

Submitted on 7 Apr 2023

**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.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

### DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Physiologie-Physiopathologies-Pharmacologie

Unité de recherche : Hypoxie et Physiopathologie

## **Etude de l'impact physiologique d'une protéine synthétique élastique dérivée de l'élastine comme signal moléculaire correcteur dans les artériopathies liées aux altérations des fibres élastiques**

## **Physiological impact of an elastin-derived synthetic elastic protein as a corrective molecular signal in arterial diseases related to alterations of elastic fibers**

Présentée par :

**Quentin BOETE**

### Direction de thèse :

**Gilles FAURY**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes

Directeur de thèse

### Rapporteurs :

**Sébastien BLAISE**

MAITRE DE CONFERENCES HDR, Université de Reims Champagne-Ardenne

**Maria Julia BUJAN VARELA**

PROFESSEUR EMERITE, Universidad de Alcalá

### Thèse soutenue publiquement le **20 décembre 2022**, devant le jury composé de :

**Gilles FAURY**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes

Directeur de thèse

**Sébastien BLAISE**

MAITRE DE CONFERENCES HDR, Université de Reims Champagne-Ardenne

Rapporteur

**Maria Julia BUJAN VARELA**

PROFESSEUR EMERITE, Universidad de Alcalá

Rapporteur

**François BOUCHER**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes

Président

**Karine PICHAVANT**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Bretagne Occidentale - Brest

Examinatrice

**Gaetan GAVAZZI**

PROFESSEUR DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER, CHU Grenoble Alpes - Université Grenoble Alpes

Examineur

### Invités :

**Anne BRIANCON MARJOLLET**

MAITRE DE CONFERENCE, Université Grenoble Alpes

**Romain DEBRET**

CHARGE DE RECHERCHE, Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique, Lyon





# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail de quatre intenses années de thèse :

- En particulier, **Sébastien Blaise** et **Maria Julia Bujan Varela** pour avoir accepté les rôles de rapporteurs et pris le temps d'analyser en détail ce manuscrit incontestablement dense et détaillé. Je vous présente d'ailleurs mes excuses pour la frayeur que vous avez pu avoir au moment de la réception du volumineux manuscrit papier !

- Merci également à François Boucher et Gaëtan Gavazzi, premièrement pour votre participation à ce jury mais également pour votre accompagnement tout au long de ces quatre années en ayant accepté de constituer mon comité de suivi de thèse (CST). Ces réunions périodiques étaient systématiquement un moment à la fois agréable et pertinent du fait des discussions engagées autant d'un point de vue scientifique que plus global et parfois même philosophique. Je ne sais toujours pas si le vieillissement est une pathologie mais je serai ravi de continuer à en débattre avec vous entre autres sujets ! Je profite de ces quelques lignes pour associer **Guillaume Vial** à ces remerciements : merci d'avoir accepté d'être mon tuteur pour les CST, mais également merci pour ta bonne humeur et pour ce grain de folie qui t'a fait accepter avec enthousiasme de te lancer dans la mesure de ces ondes de pouls sous les bonnes ondes de Nostalgie et de RKS.

- Merci à **Anne Briançon-Marjollet** et **Romain Debret** d'avoir participé à ce jury, pour vos questions et remarques qui ont contribué à la discussion riche et pertinente menée le jour de la soutenance, qui ont données des pistes à explorer pour les générations futures de doctorants du laboratoire et du projet Arterylastic. De façon plus globale, merci à **Anne** d'avoir participé à l'encadrement de ma thèse. Merci d'avoir pris le temps de répondre à mes interrogations, mais également merci pour toutes nos discussions particulièrement concernant le ski de rando, l'escalade et la montagne en générale qui permettent de s'évader et de garder à l'esprit qu'il existe autre chose que la thèse. Merci à **Romain** et à tous les acteurs du projet Arterylastic, **Ming, Kiaoling, Elise, Aurore, Iris, Marie, Stéphane, Baptiste, Maxime** pour ce travail réalisé en collaboration, pour votre bienveillance et nos discussions scientifiques passionnantes lors des réunions du consortium.

- Enfin, pour boucler la boucle, merci à **Karine Pichavant** d'avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse et d'avoir été présente pour ma soutenance, et plus largement merci de m'avoir transmis le virus de la physiologie lors de mes années de master à Brest. Merci d'avoir laissé sa chance à un étudiant infirmier fraîchement diplômé.

- Pour finir, merci à **Gilles Faury** pour ton encadrement tout au long de ces quatre années de thèse. Merci pour la confiance et la liberté que tu m'as accordées au cours de cette thèse ainsi que pour le temps que tu as consacré à nos nombreuses réunions scientifiques et d'analyses de résultats parfois interminables au vu de la quantité de données à traiter !! Merci pour ta gentillesse et pour nos discussions qui sont très régulièrement sorties du cadre de la thèse.

Je tiens également à remercier **Élise, Anne, Maximin** et plus tardivement **Emma** pour toutes ces heures d'enseignements passées ensemble. Cela a été un continuel enchantement de travailler avec vous pour tenter de transmettre l'amour de la physiologie aux étudiants.

Je remercie mes collègues et amis du laboratoire, avec une mention spéciale pour **Axel, Raph', Maximin** et **Clément** avec qui nous avons formés l'équipe des 5 fantastiques, pour la bonne humeur quotidienne que vous avez apportée au sein du laboratoire. Encore merci **Axel** d'avoir fait de ton appartement une extension du CHU de Grenoble et un magnifique service de soin de suite post-opératoire ainsi que pour ton amitié et tes conseils ! Merci plus généralement à tous les membres du laboratoire HP2 qui ont partagés mon quotidien, **Emeline, Yann, Lydie, Jonathan** et **Guillaume** pour nos discussion scientifiques mais pas seulement, généralement autour d'un café ou d'un verre. Merci à **Audrey, Sophie, Antoine, Sylvain, Mélanie, Olfa, Bilge, Claire** d'avoir partagé mon quotidien ces dernières années.

Pour conclure ces remerciements, je souhaiterais dire un grand merci à mes amis et ma famille pour leur soutien tout au long de ces années. Je pense particulièrement au duo infernal de **Tanguy** d'avoir fait du Sappey en Chartreuse leur camp de base avancé vers nos nombreuses aventures en montagne : des Bretons dans les Alpes c'est quelque chose ! Ces moments m'ont permis de garder un équilibre entre la thèse et le reste de la vie.

Enfin, merci à **Séverine** pour ton soutien inconditionnel. Tu m'as porté et supporté ces dernières années, particulièrement sur la fin de cette thèse que je n'aurais peut-être pas pu terminer sans toi. Et maintenant à nous l'aventure !!!

A tous, merci !!

# Résumé

Les fibres élastiques, composées d'élastine (90%) et de microfibrilles riches en fibrilline (10%), sont les principaux composants extracellulaires qui confèrent aux artères leur élasticité. L'altération des fibres élastiques entraîne des dysfonctionnements cardiovasculaires, comme observés dans l'haplo-insuffisance en élastine chez la souris (*Eln*<sup>+/-</sup>) ou chez l'Homme (sténose aortique supra-avalvulaire ou syndrome de Williams-Beuren), lors d'une hypoxie intermittente (le symptôme le plus délétère du syndrome d'apnée obstructive du sommeil) ou au cours du vieillissement.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre plus large du développement d'un traitement avec une protéine élastique synthétique (SEP), mimant plusieurs domaines de la tropoélastine (le précurseur de l'élastine), dont des domaines hydrophobes responsables de l'élasticité et des sites de liaison pour les récepteurs de l'élastine permettant de corriger les altérations des fibres élastiques vasculaires. Ce projet est soutenu par l'agence nationale de la recherche sous le nom de projet « Arterylastic » (ANR-18-CE18-0001). L'objectif de cette thèse a été d'évaluer l'impact bénéfique du traitement par la SEP sur le système cardiovasculaire de souris dans des conditions de dysfonctions vasculaires liées aux lésions des fibres élastiques induites par les trois différentes situations pathologiques citées précédemment dans le but d'améliorer la structure, la fonction et les propriétés mécaniques des artères.

Nous avons évalué dans trois modèles pathologiques de souris (*Eln*<sup>+/-</sup>, C57Bl6/j exposées à l'hypoxie intermittente, C57Bl6/J âgées), si la SEP restaure les paramètres cardiovasculaires altérés, à savoir : la structure artérielle et cardiaque (par étude histologique et/ou pesée des cœurs), l'élasticité de la paroi artérielle et les principaux paramètres physiologiques des souris comme la pression artérielle (mesurée par cathétérisation carotidienne), la réactivité et le comportement mécanique de segments d'artères (par artériographie de pression ou de tension), et la prolifération ou la capacité de synthèse d'élastine par des cellules musculaires lisses aortiques en culture provenant de ces animaux (étudiées par tests ELISA, qPCR et western blots). Nous avons par ailleurs testé le potentiel bénéfique de l'extrait d'aneth (administré dans l'eau de boisson à 120 mg/L) sur la structure/fonction de l'aorte abdominale de souris au cours du vieillissement.

Dans cette thèse, nous avons montré que le traitement aigu par mono-injection de SEP (12 µg/g de souris) dans la veine caudale induit une néo-synthèse de l'élastine et de la fibrilline-1 chez les animaux adultes *Eln*<sup>+/+</sup> et *Eln*<sup>+/-</sup>, un épaissement des lames élastiques aortiques chez les animaux mâles, une forte tendance à la réduction des ruptures des lames élastiques chez les souris *Eln*<sup>+/-</sup>, une modification de la longueur et de la rectitude des fibres de collagène chez les souris femelles adultes *Eln*<sup>+/+</sup> et *Eln*<sup>+/-</sup>, ainsi qu'une diminution de la rigidité de la paroi aortique, notamment chez les souris *Eln*<sup>+/-</sup> adultes des deux sexes et âgés mâles. De façon intéressante, le traitement avec la SEP abolit la dysfonction endothéliale induite par l'haploinsuffisance en élastine chez les souris femelles *Eln*<sup>+/-</sup>, la SEP n'a toutefois pas eu d'impact sur la pression artérielle. De plus, une diminution de la rigidité de la paroi aortique a également été observée chez les animaux C57Bl6/J adultes femelles normoxiques ou exposés à l'hypoxie intermittente, alors que la SEP n'a pas montré d'efficacité sur la mécanique artérielle dans le modèle de vieillissement (souris C57Bl6/J âgées). Les effets de la SEP dans ces deux derniers modèles de souris seront à compléter par de futures investigations de la structure artérielle. Les effets du traitement par la SEP sont vraisemblablement médiés par les récepteurs de l'élastine, en particulier l'Elastin Receptor Complex, et un possible rôle de l'intégration directe de la SEP dans les fibres élastiques artérielles reste à étudier.

Nous avons également testé dans cette thèse une seconde stratégie de restauration de la structure/fonction artérielle altérée par le vieillissement : le traitement chronique par l'extrait d'aneth mis en œuvre induit la synthèse d'élastine *de novo*, préserve l'intégrité des lames élastiques au cours du vieillissement, limite l'hypertrophie cardiaque liée à l'âge et diminue la rigidité de l'aorte de souris âgées.

La SEP ainsi que l'extrait d'aneth devraient donc être considérés comme des stratégies thérapeutiques avec un potentiel intéressant pour les traitements futurs des patients avec des fibres élastiques et une structure/fonction artérielle altérées.

# Abstract

Elastic fibers, composed of elastin (90%) and fibrillin-rich microfibrils (10%), are the main extracellular components that give arteries their elasticity. The alteration of elastic fibers leads to cardiovascular dysfunctions, as observed in elastin haploinsufficiency in mice (*Eln*<sup>+/-</sup>) or in Humans (supravalvular aortic stenosis or Williams-Beuren syndrome), during intermittent hypoxia (the most deleterious symptom of obstructive sleep apnea syndrome) or during aging.

This thesis is part of a larger project to develop a treatment with a synthetic elastic protein (SEP), mimicking several domains of tropoelastin (the precursor of elastin), including hydrophobic domains responsible for elasticity and binding sites for elastin receptors to correct alterations in vascular elastic fibers. This project is supported by the French National Research Agency under the name "Arterylastic" (ANR-18-CE18-0001). The objective of this thesis was to evaluate the beneficial impact of SEP treatment on the cardiovascular system of mice under conditions of vascular dysfunction related to elastic fiber damage induced by the three different pathological situations mentioned above with the aim of improving the structure, function and mechanical properties of arteries.

We evaluated in three pathological mouse models (*Eln*<sup>+/-</sup>, C57Bl6/J exposed to intermittent hypoxia, aged C57Bl6/J), whether SEP restores the altered cardiovascular parameters : arterial and cardiac structure (by histological study and/or weighing of hearts), arterial wall elasticity, and key physiological parameters in mice such as blood pressure (measured by carotid catheterization), reactivity and mechanical behavior of artery segments (by pressure or tension arteriography), and proliferation or elastin synthesis capacity by cultured aortic smooth muscle cells from these animals (studied by ELISA, qPCR, and Western blots). We also tested the beneficial potential of dill extract (administered in drinking water at 120 mg/L) on the structure/function of the abdominal aorta of mice during aging.

In this thesis, we showed that acute treatment with mono-injection of SEP (12 µg/g mouse) into the tail vein induces neo-synthesis of elastin and fibrillin-1 in adult *Eln*<sup>+/+</sup> and *Eln*<sup>+/-</sup> animals, thickening of aortic elastic laminae in male animals, a strong tendency to reduce elastic lamina rupture in *Eln*<sup>+/-</sup> mice, a change in the length and straightness of collagen fibers in adult female *Eln*<sup>+/+</sup> and *Eln*<sup>+/-</sup> mice, and a decrease in aortic wall stiffness, especially in adult male *Eln*<sup>+/-</sup> mice of both sexes. Interestingly, treatment with SEP abolished endothelial dysfunction induced by elastin haploinsufficiency in female *Eln*<sup>+/-</sup> mice; however, SEP had no impact on blood pressure. In addition, a decrease in aortic wall stiffness was also observed in adult female C57Bl6/J animals normoxic or exposed to intermittent hypoxia, whereas SEP did not show any efficacy on arterial mechanics in the aging model (aged C57Bl6/J mice). The effects of SEP in these two mouse models will need to be complemented by further investigations of arterial structure. The effects of SEP treatment are likely to be mediated by elastin receptors, in particular the Elastin Receptor Complex, and a possible role for direct integration of SEP into arterial elastic fibers remains to be investigated.

In this thesis, we also tested a second strategy to restore the arterial structure/function altered by aging: the chronic treatment with dill extract tested induces *de novo* elastin synthesis, preserves the integrity of the elastic laminae during aging, limits age-related cardiac hypertrophy, and decreases aortic stiffness in aged mice.

SEP as well as dill extract should therefore be considered as therapeutic strategies with interesting potential for future treatments of patients with altered elastic fibers and arterial structure/function.

# Principales abréviations

<b>Ach</b>	Acétylcholine
<b>AGE</b>	Advanced Glycation End products
<b>AHI</b>	index d'apnée/hypopnée
<b>APG</b>	Artère Pulmonaire Gauche
<b>ARNm</b>	Acide Ribonucléique messenger
<b>CMLV</b>	Cellule Musculaire Lisse Vasculaire
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dioxyde de carbone
<b>EA</b>	Extrait d'Aneth
<b>EBP</b>	Elastin Binding Protein
<b>EDP</b>	Peptides Dérivés de l'Élastine
<b>EIn</b>	Élastine
<b>eNOS</b>	Endothelial nitric oxide synthase
<b>ERC</b>	Elastin Receptor Complex
<b>GAG</b>	Glycosaminoglycanes
<b>HB-EGF</b>	Facteur de Croissance épidermique liant l'Héparine
<b>hTE</b>	Tropoélastine humaine
<b>IEC</b>	Inhibiteur de l'Enzyme de Conversion
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleukine-1 $\beta$
<b>Lox</b>	Lysyl OXydase
<b>Loxl</b>	Lysyl OXydase-Like
<b>LTBP</b>	Latents TGF $\beta$ -Binding Proteins
<b>MEC</b>	Matrice ExtraCellulaire
<b>MMP</b>	MétalloProtéinase Matricielle
<b>Neu-1</b>	Neurominidase-1

<b>O<sub>2</sub></b>	Dioxygène
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>PAD</b>	Pression Artérielle Diastolique
<b>PAM</b>	Pression Artérielle Moyenne
<b>PAS</b>	Pression Artérielle Systolique
<b>PE</b>	Phényléphrine
<b>PG</b>	Protéoglycanes
<b>PPCA</b>	Protective Protein/Cathepsin A
<b>RER</b>	Réticulum endoplasmique Rugueux
<b>ROS</b>	Espèce réactive de l'oxygène
<b>SAOS</b>	Syndrome d'Apnées Obstructives du Sommeil
<b>SASV</b>	Sténose Aortique SupraValvulaire
<b>SEP</b>	Protéine Synthétique Élastique
<b>SMD</b>	Standardised Mean Difference (ou difference Moyenne standardisée)
<b>SRAA</b>	Système rénine-angiotensine-aldostérone
<b>SWB</b>	Syndrome Williams-Beuren
<b>TE</b>	Tropoélastine
<b>TGF</b>	Transformation growth factor
<b>TGFβ1</b>	Facteur de croissance transformant β1
<b>TIMP</b>	Inhibiteur Tissulaire des Métalloprotéinases Matricielles
<b>TN</b>	Ténascines
<b>TNF- α</b>	Facteur de Nécrose Tumorale-α
<b>VG</b>	Ventricule Gauche
<b>VOP</b>	Vitesse de l'Onde de Pouls

# Liste des tables

Table 1 – Caractéristiques générales des animaux de l'axe hypoxie intermittente.	179
Table 2 – Caractéristiques générales des animaux de l'axe vieillissement..	183
Table 3 -Caractéristiques générales des animaux de l'axe multifactoriel déficience génétique et vieillissement.....	186

# Liste des figures

Figure 1 - Schéma de l'appareil circulatoire.....	4
Figure 2 - Hématocrite et proportion des cellules sanguines. ....	5
Figure 3 – Position du cœur dans le thorax. ....	7
Figure 4 - Système de conduction spécialisé du cœur et diffusion de l'excitation. ....	8
Figure 5 - Schéma détaillé d'un cycle cardiaque. ....	10
Figure 6 – Écoulement de sang dans le cœur et action de la pompe cardiaque. ....	12
Figure 7 – Facteurs déterminant le débit cardiaque.....	14
Figure 8 - Schéma des différents types de vaisseaux sanguins en termes de diamètre et de structure.....	16
Figure 9 - Représentation schématique de la pression artérielle moyenne le long de l'arbre vasculaire. Reflet de la transformation de pression pulsatile proximale en pression distale continue. ....	17
Figure 10 - Principaux facteurs déterminant la résistance vasculaire périphérique (systémique) totale. ....	19
Figure 11 - Structure des vaisseaux sanguins .....	21
Figure 12 - Organisation des lames élastiques en fonction de la taille des artères. ...	22
Figure 13 - Schéma du passage transcellulaire et paracellulaire à travers la barrière endothéliale.....	23
Figure 14 – Représentation schématique de la composition des jonctions inter-endothéliales. ....	24
Figure 15 - Mécanismes de la contraction de la cellule musculaire lisse vasculaire (CMLV).....	27
Figure 16 - Rôle des fibroblastes dans le contrôle de la fonction vasculaire. ....	29
Figure 17 - Image par microscopie électronique à transmission (MET) à coloration négative d'une microfibrille. ....	34
Figure 18 - Représentation schématique des structures de domaine des membres de la superfamille de la fibrilline, y compris les fibrillines1-3 et les LTBP1-4. ....	38
Figure 19 – Formation et complexité des microfibrilles. ....	39
Figure 20 – Structure de la tropoélastine humaine.. ....	40
Figure 21 –Structure tridimensionnelle de la tropoélastine et modèle proposé d'interactions entre les domaines impliqués dans la réticulation de la tropoélastine.....	41
Figure 22 - Profil comparé de l'expression de l'élastine et des fibrillines 1 et 2 chez la souris.....	42

Figure 23 - L'assemblage des fibres élastiques. ....	43
Figure 24 - Schéma de l'assemblage des microfibrilles et des fibres élastiques : assemblage de l'élastine.....	48
Figure 25 - Synthèse de l'élastine : réseaux de régulation moléculaire.....	50
Figure 26 - Activités biologiques, médiées par les peptides d'élastine via l'activation du récepteur d'élastine. ....	50
Figure 27 - Genèse des peptides dérivés de l'élastine (EDP) et leur influence sur les fonctions cellulaires. ....	54
Figure 28 - Diagramme illustrant les contributions relatives des fibres élastiques et des fibres de collagène aux propriétés mécaniques de la paroi artérielle. ....	57
Figure 29 - Schéma du réseau d'étirement et de retour des molécules d'élastine. ...	58
Figure 30 - Contributions de l'élastine et du collagène à la réponse tension-longueur des artères iliaques humaines. ....	59
Figure 31 - Diagramme représentant le déclin des principales fonctions de l'organisme. .....	62
Figure 32 - Événements moléculaires et cellulaires survenant au cours du vieillessement vasculaire. ....	63
Figure 33 - Structuration de la matrice extracellulaire et des composants cellulaires dans la paroi aortique en fonction de l'âge.....	65
Figure 34 - Le continuum du vieillissement vasculaire.....	66
Figure 35 - Relation entre la fréquence cardiaque au repos et l'espérance de vie chez les mammifères. ....	67
Figure 36- Remodelage de l'élastine au cours du vieillissement vasculaire. ....	68
Figure 37 – Coupe de la média aortique d'échantillons d'une aorte d'un individu jeune et d'une aorte d'un individu âgé. ....	69
Figure 38 - Schéma de la réaction de Maillard résumant les principales voies de glycation connues impliquées dans la rigidité artérielle.....	71
Figure 39 - Changement de pression pulsatile dans l'arbre vasculaire.. ....	75
Figure 40 – Altération de la fonction artérielle au cours du vieillissement. ....	76
Figure 41 – Effet de la rigidité artérielle sur le cœur. ....	77
Figure 42 – Mécanisme du remodelage vasculaire dans l'hypertension artérielle.....	79
Figure 43 - Schéma des réponses différentielles des grandes (élastiques), moyennes (musculaires) et petites (artérioles) artères à une augmentation soutenue de la pression sanguine.....	80
Figure 44 - Représentation schématique des glycoprotéines membranaires régulées par la désialylation via NEU1 et pertinence biologique potentielle dans diverses maladies. ....	84
Figure 45 - Prévalence estimée du syndrome d'apnées obstructives du sommeil dans le monde.....	85
Figure 46 – Conséquences délétères de l'hypoxie intermittente. ....	86

Figure 47 – Conséquence de l'hypoxie intermittente sur le remodelage vasculaire d'aortes de souris exposées à un protocole d'hypoxie intermittente de 14 jours. ....	88
Figure 48 - Angiogramme d'un patient de 4 ans atteint de SASV. ....	91
Figure 49 – Coupe transversales d'aortes ascendante d'un patient atteinte du SWB contre celle d'un individu sain. ....	93
Figure 50 - coupes transversales d'aortes descendantes d'un témoin sain et d'un humain atteint de SASV.....	94
Figure 51 – Effets de la déficience en élastine sur le développement précoce d'aortes ascendantes de souris.....	95
Figure 52 - Effet interdépendant des chromosomes sexuels et des hormones sur les maladies vasculaires chez la femme, avant et après ménopause.....	97
Figure 53 – Cibles possibles de stratégies thérapeutiques visant à modifier les fibres élastiques et à influencer sur la rigidité artérielle et la pression artérielle.....	98
Figure 54 - Techniques chirurgicales utilisées pour le soulagement de la sténose aortique supra- valvulaire.....	99
Figure 55 - Événements cellulaires et voies de signalisation impliqués dans la néosynthèse des fibres élastiques induite par des traitements pharmacologiques. ....	103
Figure 56 - Séquence primaire de la SEP, protocole résumé de la production de SEP et caractérisation thermique du profil de coacervation.....	107
Figure 57 - Colocalisation de la SEP avec les dépôts d'élastine fibrillaire dans des cultures de fibroblastes dermiques. ....	108
Figure 58 - Étude de l'adhérence cellulaire de la SEP.....	109
Figure 59 - Anatomie d'un zebra fish.....	110
Figure 60 - Répartition des groupes en fonction des modèles pathologiques.....	112
Figure 61 –Schéma du vecteur de ciblage conçu pour supprimer le promoteur et l'exon 1 du gène Eln chez la souris.....	115
Figure 62 – Dispositif d'exposition à l'hypoxie intermittente.....	117
Figure 63 - Exemple de courbes de pression au niveau de l'artère carotide et de l'artère fémorale enregistrées chez un male Eln <sup>+/+</sup> afin de mesurer la vitesse d'onde de pouls.....	119
Figure 64 - Dispositif et procédure d'artériographie de pression.....	120
Figure 65 - Courbes diamètre-pression et épaisseur de la paroi-pression de l'aorte ascendante de souris normoxiques ou exposées à une hypoxie intermittente.....	181
Figure 66 - Paramètres mécaniques de l'aorte ascendante de souris normoxiques ou exposées à une hypoxie intermittente.....	182
Figure 67 - Courbes diamètre-pression et épaisseur de la paroi-pression de l'aorte ascendante de souris ayant subi un vieillissement important.....	184

Figure 68 - Paramètres mécaniques de l'aorte ascendante de souris ayant subi un vieillissement important. ....	185
Figure 69 - Courbes diamètre-pression et épaisseur de la paroi-pression de l'aorte ascendante de souris Eln <sup>+/+</sup> et Eln <sup>+/-</sup> ayant subi un vieillissement important. ....	187
Figure 70 - Paramètres mécaniques de l'aorte ascendante de souris Eln <sup>+/+</sup> et Eln <sup>+/-</sup> ayant subi un vieillissement important. ....	189
Figure 71 - Analyse phytochimique des graines, feuilles et racines d'aneth. ....	191
Figure 72 - Diagramme de flux de l'étude (méta-analyse). ....	215
Figure 73 - Exemple d'Orchard Plot montrant la signification des différentes parties du diagramme. ....	216
Figure 74 - Histologie en immunofluorescence de coupes d'aortes ascendantes injectées à des doses croissantes de SEP (1 et 12 µg de SEP/10g de souris) comparées à une coupe d'aorte thoracique témoin non injectée. ....	254
Figure 75 - Histologie en immunofluorescence de coupes d'aortes ascendantes injectées avec une solution de NaCl (témoins) ou injectées par une solution de SEP. ....	256
Figure 76 - Image d'un western blot réalisé avec un anticorps anti-FLAG montrant l'absence de spécificité de l'anticorps anti-FLAG. ....	256
Figure 77 - Image d'un western blot réalisé à partir d'un protocole de détection streptavidine/biotine, montrant l'absence de détection de protéines au poids moléculaire de référence. ....	257

# Sommaire

Remerciements .....	
Résumé.....	
Abstract.....	
Principales abréviations .....	
Liste des tables .....	
Liste des figures .....	
Sommaire.....	
Introduction .....	1
1 Physiologie cardio-vasculaire .....	4
1.1 Structure et fonction de l'appareil circulatoire .....	4
1.1.1 Le sang.....	5
1.1.2 Le cœur .....	6
1.1.3 Les vaisseaux sanguins.....	15
1.2 Structure des artères .....	20
1.2.1 Les cellules.....	22
1.2.2 La matrice extracellulaire vasculaire .....	29
2 Matrice extra cellulaire vasculaire .....	30
2.1 Les collagènes .....	30
2.2 Les glycoprotéines .....	31
2.3 Les protéoglycanes .....	32
2.4 Les fibres élastiques.....	33
2.4.1 Les microfibrilles .....	34
2.4.2 L'élastine .....	40
2.4.3 Synthèse et assemblage des fibres élastiques : l'élastogenèse .....	42
2.4.4 Maturation des fibres élastiques .....	48
2.4.5 Régulation de la synthèse d'élastine.....	49
2.4.6 Rôle biologique de l'élastine et des peptides d'élastine.....	50
2.5 Rôle structural et mécanique de la matrice extracellulaire .....	56
3 Altération des fibres élastiques et pathologies.....	60
3.1 Le vieillissement artériel normal .....	61
3.1.1 Mécanismes moléculaires du vieillissement artériel .....	66
3.1.2 Conséquences fonctionnelles du vieillissement vasculaire : l'artériosclérose .....	75

3.2	Le vieillissement pathologique du système vasculaire .....	78
3.2.1	L'hypertension artérielle .....	78
3.2.2	L'athérosclérose .....	81
3.2.3	Les anévrismes vasculaires .....	82
3.2.4	Conséquences pathologiques des EDP .....	83
3.2.5	Les conséquences pathologiques du syndrome d'apnées obstructives du sommeil.....	84
3.3	Altérations génétiques des composants des fibres élastiques et pathologies vasculaires.....	88
3.3.1	Atteintes génétiques des composants des fibres élastiques .....	88
3.4	Effet du sexe sur la rigidité artérielle.....	96
4	Actions visant à restaurer les propriétés mécaniques artérielles .....	98
4.1	Traitements chirurgicaux .....	98
4.2	Traitements préventifs liés à l'hygiène de vie .....	100
4.2.1	La nutrition .....	100
4.2.2	L'exercice physique .....	101
4.3	Traitements pharmacologiques visant à corriger les altérations de la matrice extracellulaire .....	101
4.3.1	Inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) et bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine II .....	101
4.3.2	Ouvreurs des canaux potassiques (KATP) .....	102
4.3.3	Inhibition de la voie de signalisation Ras/MEK/ERK.....	103
4.3.4	Traitement par l'extrait d'aneth.....	104
4.3.5	Blocage de l'interaction EDP/ERC et des voies de signalisation médiées par l'ERC.....	104
4.3.6	Inhibition de l'activité de la sialidase Neu-1 .....	104
5	Nouvelle stratégie thérapeutique, résultats préliminaires et hypothèse de travail ..	106
5.1	Explication de la stratégie et conception de la SEP .....	106
5.2	Résultats préliminaires .....	108
5.3	Objectifs de la thèse .....	111
	Matériel & méthodes .....	113
	Modèles animaux .....	114
1.1	Modèle de déficience génétique en élastine .....	114
1.2	Modèle de vieillissement .....	115
1.3	Modèle d'exposition à l'hypoxie intermittente.....	116
2	Administration de la SEP .....	117

3	Anesthésie et prélèvements .....	117
4	Évaluation des paramètres hémodynamiques .....	118
4.1	Mesure de la pression artérielle par cathétérisme de la carotide .....	118
4.2	Mesure de la vitesse d'onde de pouls .....	118
5	Mécanique vasculaire.....	119
5.1	Dissection et canulation des vaisseaux sanguins .....	119
5.2	Artériographie de pression : Mesure des diamètres artériels en fonction de la pression intraluminale .....	121
5.3	Évaluation des propriétés mécaniques des vaisseaux.....	122
5.3.1	La distensibilité artérielle.....	122
5.3.2	Le stress circonférentiel de la paroi.....	123
5.3.3	L'étirement circonférentiel de la paroi .....	124
5.3.4	Le module incrémental d'élasticité .....	124
5.4	Évaluation de la réactivité vasculaire.....	124
6	Longueur de l'aorte ascendante, réactivité et mécanique d'anneaux de vaisseaux - artériographie de tension.....	125
7	Pesée des cœurs .....	126
8	Colorations histologiques et analyse d'images .....	126
8.1	Coloration des fibres élastiques - Acide orcéine (selon la méthode de Shikata) .....	126
8.2	Coloration des fibres de collagène - Rouge Picrosirius.....	126
9	Mesure de l'expression de gènes d'intérêt par PCR quantitative .....	127
9.1	Extraction de l'ADN et de l'ARN.....	127
9.2	Transcription inverse et analyse quantitative par PCR en temps réel .....	127
10	Mesure de l'expression de protéines d'intérêt par western blot.....	128
11	Culture cellulaire.....	129
11.1	Culture primaire de CMLVs .....	129
11.2	Prolifération (MTT) .....	129
11.3	Quantification de l'élastine extracellulaire par test ELISA .....	129
12	Analyse statistique.....	130
	Résultats .....	131
1	Axe correction des effets délétères de la déficience génétique en élastine .....	132
1.1	Article 1 : Impact physiologique d'une protéine élastique synthétique dans les maladies artérielles liées aux altérations des fibres élastiques, effet sur l'aorte ascendante de souris mâles et femelles haploinsuffisantes en élastine.....	132
1.2	Principaux résultats et discussion de l'article 1 .....	177
2	Axe hypoxie intermittente .....	179

2.1	Caractéristiques générales des animaux.....	179
2.2	Pression artérielle et mesure de la vitesse d'onde de pouls .....	180
2.3	Résultats d'artériographie de pression .....	180
2.3.1	Aorte ascendante.....	180
3	Axe vieillissement.....	183
3.1	Caractéristiques générales des animaux.....	183
3.2	Résultats d'artériographie de pression .....	183
3.2.1	Aorte ascendante.....	183
4	Axe multifactoriel déficience génétique et vieillissement .....	186
4.1	Caractéristiques générales des animaux.....	186
4.2	Résultats d'artériographie de pression .....	186
5	Projets complémentaires.....	190
5.1	Article 2 : L'extrait d'aneth induit la néosynthèse de fibres élastiques et une amélioration fonctionnelle de l'aorte ascendante de souris âgées, avec réversion de l'hypertrophie cardiaque liée à l'âge et implication de la lysyl oxidase-like-1. ....	191
5.1.1	Présentation de l'article.....	191
5.1.2	Principaux résultats et discussion de l'article 2 .....	212
5.2	Article 3 : Meta-analyse des altérations de la structure et de la fonction vasculaires liées à l'hypoxie intermittente chez les rongeurs.....	214
5.2.1	Introduction de l'article .....	214
5.2.2	Principaux résultats de l'article 3.....	239
5.2.3	Discussion de l'article 3 .....	239
	Discussion générale .....	244
1	Impact du traitement SEP et de l'extrait d'aneth sur la pression sanguine et le cœur .....	245
2	Impact du traitement SEP et de l'extrait d'aneth sur la structure et la mécanique aortique .....	247
3	Mécanismes d'action de la SEP et de l'extrait d'aneth sur la structure-mécanique aortique .....	249
4	Impact du traitement SEP sur la réactivité aortique .....	251
5	Différences liées au sexe dans la réponse au traitement par la SEP .....	252
6	Questionnements sur la présence de SEP dans la paroi de l'aorte .....	253
	Conclusions et perspectives.....	259
	Références.....	261
	Annexe 1 .....	312

# Introduction

Cette thèse concernant l'« Étude de l'impact physiologique d'une protéine synthétique élastique dérivée de l'élastine comme signal moléculaire correcteur dans les artériopathies liées aux altérations des fibres élastiques » s'inscrit dans le cadre plus large du développement d'une protéine synthétique élastique (SEP) permettant de corriger les altérations des fibres élastiques vasculaires, soutenu par l'agence nationale de la recherche sous le nom de projet « Arterylastic » (ANR-18-CE18-0001). Il s'agit d'une étude tripartite en collaboration entre :

- Le laboratoire de biologie tissulaire et d'ingénierie thérapeutique (LBTI, Lyon) coordinateur du projet et chargé de la production de la SEP, de son analyse sur le modèle du zebrafish, de l'étude de son impact sur la contractilité artérielle de souris ainsi que des analyses histologiques des fibres élastiques,
- La structure de recherche des écoles des mines (ARMINES-CIS, Saint-Etienne) chargée de la réalisation d'un modèle prédictif théorique du comportement interne des lames élastiques par approche mathématique multi-échelles,
- Et enfin, le laboratoire Hypoxie et Physiopathologies cardiovasculaires et respiratoires (HP2, Grenoble) qui m'accueille pour cette thèse, chargé de l'évaluation de l'efficacité physiologique *in vivo* et *ex vivo* de la SEP sur différents modèles de souris.

Ce projet est motivé par l'incidence en santé publique de diverses pathologies artérielles liées à la dégradation des fibres élastiques (composants de la matrice extracellulaire responsables de l'élasticité des artères, composés à 90% d'élastine) (Fhayli, Boëté et al. 2019). Ces altérations peuvent être observées dans :

- Le vieillissement : avec le temps, la répétition de la contrainte sur la paroi artérielle associée à de nombreux mécanismes délétères vont altérer les fibres élastiques et provoquer en outre une diminution de l'élasticité ainsi qu'une augmentation de la rigidité artérielle (Fhayli, Boëté et al. 2019),
- Les maladies génétiques liées à l'élastogénèse incluant :
  - o Le syndrome de Williams-Beuren (SWB), pathologie génétique provoquée par la délétion d'une région entière sur le chromosome 7. Cette pathologie provoque des troubles multi-systémiques associés à des anomalies cardiovasculaires typiques, notamment une hypertrophie de la paroi artérielle ainsi qu'une sténose aortique supra-valvulaire (R. T. Collins et al. 2010; Kozel et al. 2014),
  - o La sténose aortique supra-valvulaire (SASV), induite par une déficience génétique hétérozygote du gène de l'élastine, se manifeste par un rétrécissement ou une obstruction de l'aorte ascendante (Ewart et al. 1993),

- Ainsi que dans des conditions pathologiques telles que l'hypoxie intermittente (HI) induite notamment par le syndrome d'apnée obstructive du sommeil (SAOS). Au cours de ce syndrome, une accélération de la dégradation physiologique des fibres élastiques a été observée (Arnaud, Beguin, et al. 2011b).

Ces différentes affections sont causées, au moins en partie, par la dégradation des fibres élastiques artérielles et, conduisent par voie de conséquence à l'hypertrophie, la souffrance voire l'insuffisance cardiaque, couplée à une hémodynamique altérée, et induisant une mauvaise perfusion et une dysfonction d'organes. La réparation des fibres élastiques dégradées est donc un enjeu thérapeutique de première importance. Par ailleurs, hormis les interventions chirurgicales (angioplastie, endoprothèse vasculaire et pontage coronarien, par exemple) qui ne traitent pas les causes profondes et pour lesquelles le rapport bénéfice/risque doit être soigneusement évalué, il n'existe actuellement aucun traitement permettant de prévenir, bloquer ou traiter toute perte d'élasticité. Une pharmacothérapie classique visant à restaurer la quantité ou la structure/fonction de l'élastine et des fibres élastiques pourrait prévenir et guérir les malformations artérielles et les dysfonctionnements cardiovasculaires ultérieurs dans les cas de remodelage de la paroi artérielle, et un certain nombre d'études ont déjà été réalisées (Raveaud et al. 2009; Coquand-Gandit et al. 2017; W. Fhayli et al. 2019). Cependant, des effets secondaires de certaines des premières molécules testées (tels qu'une hypertrichose ou des œdèmes pour le minoxidil) rendent cette stratégie possiblement complexe à utiliser (Oye, Oye, et Ali 2021; Moravec et al. 1994). En outre, des endoprothèses fonctionnalisées avec des fragments d'élastine ou de tropoélastine à leur surface ont été proposées pour prévenir la re-sténose *in vivo*. Bien que cette stratégie ait eu un impact significatif sur la sténose, elle n'a pas réduit la rigidité de la paroi artérielle, n'a eu aucun effet sur l'hypertension et les composés élastiques exogènes n'ont pas été intégrés dans le réseau élastique endogène (de Torre et al. 2015).

Il apparaît donc, d'un point de vue biomécanique, que l'introduction d'une molécule artificielle exogène favorisant l'élasticité à l'intérieur de la paroi artérielle constituerait l'action la plus triviale pour limiter la rigidité artérielle. Soit en s'intégrant directement aux fibres élastiques naturelles pré-existantes pour en améliorer la fonction, soit en stimulant la re-synthèse de fibres élastiques endogènes. Cependant, cette hypothèse reste actuellement limitée en raison de problèmes chimio-biologiques puisqu'à ce jour aucune molécule n'a montré d'efficacité clinique curatif ou prophylaxique sur la synthèse et/ou la réparation des fibres élastiques altérées. Arterylastic propose de déverrouiller cette barrière technologique en utilisant une protéine élastique synthétique originale (SEP) inspirée de la protéine précurseur de l'élastine humaine, la tropoélastine (hTE).

L'objectif est de restaurer (ou du moins d'améliorer) la fonction et les propriétés mécaniques de l'artère de souris dans des conditions de dysfonctions vasculaires liées aux lésions des fibres élastiques, induites par :

- La déficience génétique en fibres élastiques,
- Le vieillissement,
- L'hypoxie intermittente.

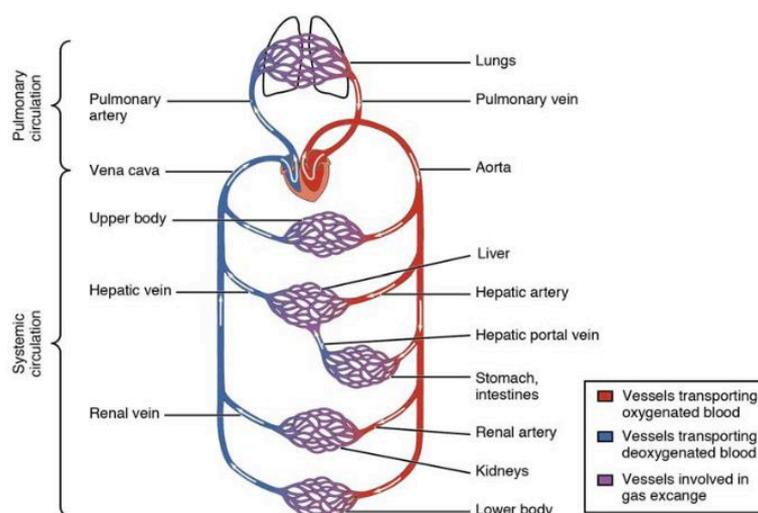
Le but de la présente thèse est d'investiguer si la SEP présente un potentiel thérapeutique pour traiter les défauts d'élasticité vasculaire liés à une altération des fibres élastiques. Afin de mieux comprendre les enjeux de l'étude d'une telle molécule, les pages qui suivent serviront à introduire de façon globale le système cardiovasculaire et sa physiologie puis s'intéresseront de façon plus précise à la structure et la fonction artérielle. Cela nous permettra d'évoquer les principales pathologies entraînant une dégradation des fibres élastiques ainsi que les différentes stratégies thérapeutiques entreprises à ce jour avant de terminer sur l'intérêt de l'étude d'une nouvelle stratégie thérapeutique et des moyens mis en œuvre pour étudier cette protéine synthétique élastique.

# 1 Physiologie cardio-vasculaire

Claude Bernard, en 1865, dans son *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale*, crée le concept suivant : « *Tous les mécanismes vitaux, quelque variés qu'ils soient, n'ont toujours qu'un but, celui de maintenir l'unité des conditions de la vie dans le milieu intérieur.* ». C'est à partir de cette constatation qu'est née quelques années plus tard la notion d'homéostasie, du grec *stasis* : « état, position » et *homoios* : « égal, semblable à ». En physiologie, la notion d'état stationnaire (steady state), ou d'équilibre dynamique, est absolument essentielle. Elle permet de comprendre comment le système biologique tend à se donner les conditions optimales de son fonctionnement. Tout organisme vivant va devoir faire face à des contraintes externes auxquels il va devoir réagir pour maintenir l'équilibre du milieu intérieur, et le système cardiovasculaire ne fait pas exception. Tout au long de la vie, des contraintes internes et externes à l'organismes vont provoquer des changements dans l'arbre cardiovasculaire. Ce dernier va donc devoir constamment s'adapter pour maintenir des conditions optimales de fonctionnement.

## 1.1 Structure et fonction de l'appareil circulatoire

L'appareil circulatoire est constitué de trois parties fondamentales : le cœur dont le rôle central de pompe permet de fournir l'énergie nécessaire au sang pour irriguer toutes les parties de l'organisme, les vaisseaux sanguins qui ont un rôle de contenance et de transport du sang, à l'image de tuyaux permettant le transport sanguin et enfin le sang, qui est un organe liquide permettant la distribution des éléments nécessaires au maintien de l'homéostasie de l'ensemble de l'organisme. L'appareil circulatoire est divisé en deux parties distinctes : la circulation pulmonaire qui fait circuler le sang depuis la partie droite du cœur vers les poumons avant de retourner du côté gauche du cœur pour être éjecté dans la circulation dite systémique qui va irriguer l'ensemble des organes avant de retourner dans la partie droite du cœur pour débiter un nouveau cycle (Figure 1).

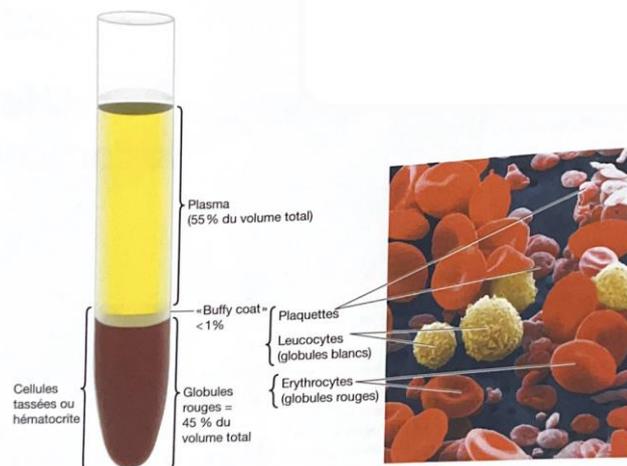


**Figure 1 - Schéma de l'appareil circulatoire. Le circuit pulmonaire déplace le sang du côté droit du cœur vers les poumons et le ramène vers le cœur. Le circuit systémique déplace le sang du côté gauche du cœur vers la tête et le corps et le renvoie vers le côté droit du cœur pour répéter le cycle. Les flèches indiquent**

*la direction du flux sanguin, et les couleurs indiquent les niveaux relatifs de concentration d'oxygène.* (QUT pressbook, Anatomy & Physiology, (« Chapter 7: THE CARDIOVASCULAR SYSTEM: BLOOD VESSELS AND CIRCULATION – Anatomy & Physiology » s. d.))

### 1.1.1 Le sang

Le sang est un tissu liquide dans lequel sont transportés les éléments nécessaires à l'homéostasie de l'organisme. Il apporte à toutes les cellules de l'organisme les éléments nécessaires à leur fonctionnement. Il est constitué d'un fluide aqueux, le plasma, qui est un moyen de transport et de différents types de cellules, principalement les hématies (globules rouges jouant le rôle du transport de l'O<sub>2</sub>), les leucocytes (globules blancs, ayant pour fonction la défense de l'organisme) et les plaquettes (fragments de cellules présentant un rôle majeur dans l'hémostase), 99% des cellules sanguines étant des hématies. Grâce à l'écoulement permanent du sang dans la circulation, les cellules sont dispersées de façon homogène dans le plasma. Cependant, si l'on met dans un tube à centrifuger un échantillon de sang complet, les cellules se déposent au fond et le plasma reste sur le dessus. Comme 99% des cellules sanguines sont des hématies, le volume des cellules présent dans le tube, qui correspond à l'hématocrite, correspond essentiellement au pourcentage volume occupé par les globules rouges. Il est en moyenne de 42% à 45% du volume total chez l'Homme. Les globules blancs et les plaquettes représentent quant à elles moins de 1% du volume sanguin total (Figure 2) (Sherwood « Physiologie humaine », 3<sup>e</sup> édition, p297-339).



**Figure 2 -Hématocrite et proportion des cellules sanguines.** (Sherwood « Physiologie humaine », 3<sup>e</sup> édition, p 298)

Le rôle principal du sang est l'apport d'oxygène et de nutriments aux cellules de l'organisme, mais ce n'est pas son unique rôle. Il est également en outre impliqué dans :

- La défense de l'organisme, due à la présence des leucocytes. On parle d'immunité pour définir la capacité de l'organisme à résister à des substances étrangères potentiellement dangereuses pour l'organisme ou à l'élimination de

cellules anormales. La première ligne de défense de l'organisme sont les barrières épithéliales qui entourent les surfaces extérieures du corps (la peau) et recouvrent les cavités internes qui sont en contact avec l'environnement (comme les tractus digestif et respiratoire par exemple) bien que ces barrières ne fassent pas partie du système immunitaire. Les leucocytes et leurs produits constituent le système immunitaire qui joue un rôle crucial dans la reconnaissance et la destruction ou la neutralisation de matériaux identifiés comme différent du « soi ». La principale raison de la présence des leucocytes dans le sang est de pouvoir être rapidement transportés depuis leur site de production ou de stockage vers les zones où ils doivent intervenir. On distingue l'immunité naturelle, qui n'est pas spécifique d'un agent infectieux et qui fait intervenir des cellules possédant des propriétés de phagocytose (monocytes, macrophages ou encore les granulocytes neutrophiles), de l'immunité acquise spécifiquement dirigée contre un agent pathogène que l'organisme a déjà rencontré. L'immunité acquise se caractérise par une mémoire immunitaire et une spécificité, elle est principalement médiée par les lymphocytes.

- L'hémostase qui s'oppose à la perte de sang consécutive aux lésions vasculaires. L'hémostase comporte trois étapes principales : le spasme vasculaire correspondant à la contraction du vaisseau lésé, la formation d'un clou plaquettaire par agrégation des plaquettes et la formation d'un caillot pour lequel intervient une cascade de coagulation complexe faisant intervenir différents facteurs plasmatiques de coagulation,
- La thermorégulation, l'eau plasmatique, moyen de transport des matériaux dans le sang, possède également une forte capacité thermique. En effet, le plasma absorbe et transporte la chaleur produite par l'activité métabolique des tissus sans variation importante de sa température. L'excès de chaleur, qui n'est pas utile au maintien de la température du corps, est éliminé vers l'environnement extérieur au passage du sang dans la circulation cutanée,
- La communication cellulaire, via le transport d'hormones, de cytokines ou encore de chimiokines,
- Le maintien de l'osmolalité de l'organisme, en effet, différentes substances organiques et inorganiques sont dissoutes dans le plasma. Les électrolytes les plus abondants sont les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ , les deux constituants du sel. Les ions  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  tout aussi importants pour le fonctionnement de l'organisme sont présents en plus petites quantités. Ces ions du liquide extracellulaire ont des rôles essentiels pour l'excitabilité des membranes cellulaires, les mouvements d'eau par osmose et le tamponnement du pH.

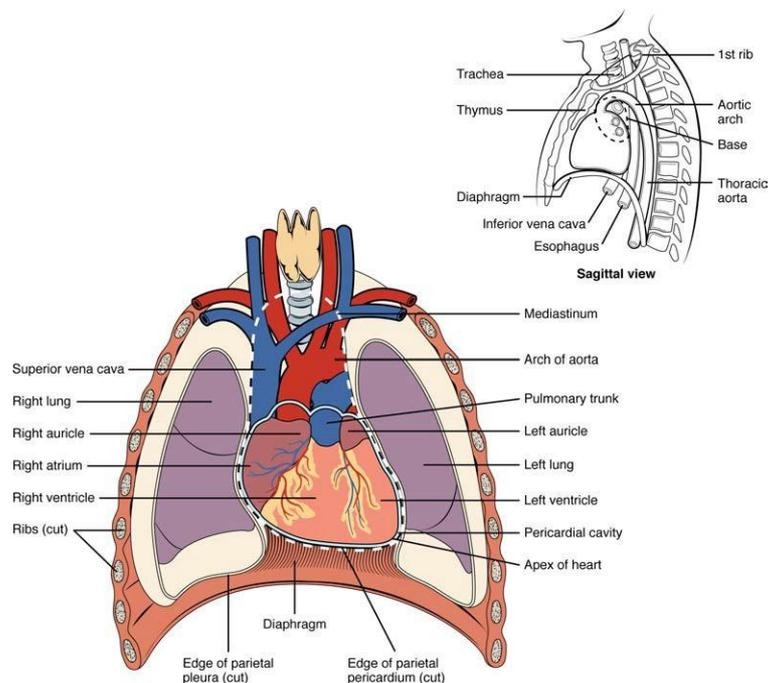
Comme tous les fluides, le sang coule d'une région de haute pression (générée par le cœur) vers une zone de basse pression au niveau des organes que ce soit au sein de la circulation systémique ou pulmonaire. C'est le ralentissement de la vitesse du flux sanguin et l'étranglement des capillaires qui permet l'échange de nutriments et de produits du métabolisme entre le sang et les tissus via les pores présents au niveau de la paroi des capillaires ou via des transporteurs facilitant la diffusion de certaines molécules comme le glucose (Sherwood « Physiologie humaine », 3<sup>e</sup> édition, p277-278).

### 1.1.2 Le cœur

Le cœur est un organe jouant le rôle de pompe fournissant au sang l'énergie nécessaire à son écoulement vers les tissus. Ce rôle, et de façon plus générale celui

du système cardiovasculaire, est d'une importance vitale pour l'organisme, en cohérence avec le fait que le cœur est le premier organe embryonnaire fonctionnel (dès la 5<sup>ème</sup> semaine de grossesse, souvent avant même la prise de connaissance de l'existence de l'embryon par la mère) (Masson s. d.; Mohun et Weninger 2011).

Le cœur est situé dans la cavité thoracique, entre les deux poumons dans l'espace appelé médiastin (Figure 3). Séparé des autres structures médiastinales (œsophage, trachée et bronches) par le péricarde, fine membrane délimitant la cavité péricardique dans laquelle se loge le cœur (Figure 3).

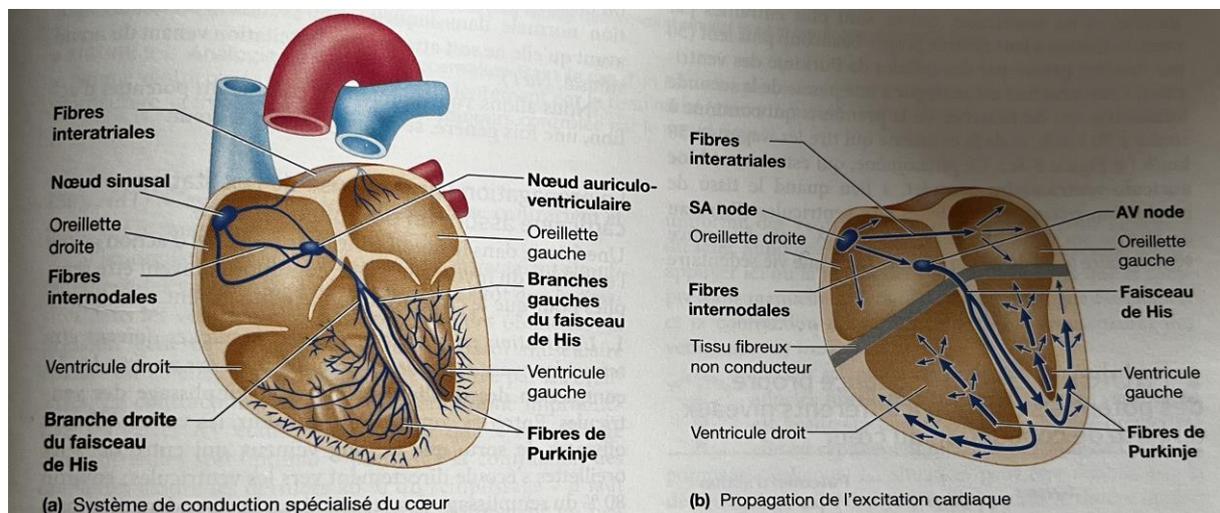


**Figure 3 – Position du cœur dans le thorax.** (QUT pressbook, Anatomy & Physiology, (« Chapter 7: THE CARDIOVASCULAR SYSTEM: BLOOD VESSELS AND CIRCULATION – Anatomy & Physiology » s. d.)

Le cœur est constitué de quatre cavités musculaires divisées en deux parties distinctes, le cœur droit et le cœur gauche, chacune divisée en deux cavités : une oreillette (ou atrium) et un ventricule. Les oreillettes reçoivent le sang de la circulation sanguine, elles permettent le passage du sang des veines (caves à gauche, pulmonaire à droite) vers les ventricules. L'écoulement du sang dans le cœur se fait uniquement des oreillettes vers les ventricules et de ces derniers vers les grosses artères. Le sens de l'écoulement est imposé par quatre valves unidirectionnelles qui s'ouvrent et se ferment de façon passive sous l'influence de la différence de pression de part et d'autre de ces valves. Les ventricules quant à eux fournissent, *via* leur contraction, l'énergie nécessaire pour alimenter en sang l'entièreté de l'organisme (Figure 6a). Le cœur a la particularité d'être un organe doué d'automatisme, en effet, la contraction du myocarde (tissu musculaire cardiaque) est déclenchée par un potentiel d'action qui gagne la membrane de toutes les cellules du muscle cardiaque. Les battements rythmiques du cœur sont dus aux potentiels d'action auxquels il donne spontanément naissance (Sherwood « Physiologie humaine », 3<sup>e</sup> édition, p234-235). Il existe par ailleurs deux variétés de cellules musculaires cardiaques :

- 90% d'entre elles sont des cellules contractiles produisant la force mécanique de la pompe cardiaque. Ces cellules ne donnent pas spontanément naissance à leur propre potentiel d'action,
- Les cellules autorythmiques sont présentes en nombre plus restreint, leur rôle est de générer et de conduire le potentiel d'action responsable de l'excitation des cellules contractiles.

Chaque potentiel d'action initié au niveau du nœud sinusal se diffuse dans un premier temps dans les deux oreillettes. Sa diffusion est facilitée par les deux voies de conduction spécialisées des oreillettes : les voies inter-atriales et inter-nodale. Le nœud auriculo-ventriculaire est la seule structure capable de transmettre le potentiel d'action des oreillettes vers les ventricules. A partir du nœud auriculo-ventriculaire, le potentiel d'action se propage rapidement au travers des ventricules en suivant le faisceau de His puis les fibres de Purkinje (Figure 4) (Sherwood « Physiologie humaine », 3<sup>e</sup> édition, p234-235).



**Figure 4 - Système de conduction spécialisé du cœur et diffusion de l'excitation.** (Sherwood « Physiologie humaine », 3<sup>e</sup> édition, p 234)

Ainsi, les évènements mécaniques du cycle cardiaque (contraction, relâchement et écoulement résultat du sang) sont les conséquences des modifications rythmiques de l'activité électrique. Un cycle cardiaque est l'alternance de la contraction des ventricules (systole) résultant en la vidange de ce dernier suivi d'un relâchement des ventricules (diastole) permettant aux ventricules de se remplir de nouveau. La contraction résulte de la propagation de l'excitation dans le myocarde, le relâchement, a lieu lors de la repolarisation consécutive des ventricules. De façon plus précise, le cycle cardiaque est un enchainement précis d'évènements. Nous prendrons ici l'exemple d'un cycle cardiaque débutant à la fin de la diastole ventriculaire (Sherwood « Physiologie humaine », 3<sup>e</sup> édition, p244-246).

- A ce stade du cycle cardiaque, les oreillettes sont relâchées permettant au sang d'entré de façon passive. La pression à l'intérieur des oreillettes va ainsi légèrement augmenter (Figure 5 [1]) et va devenir supérieur à la pression au sein des ventricules. A cause de cette différence de pression, les valves auriculo-ventriculaires s'ouvrent faisant augmenter le volume ventriculaire (Figure 5 [2], Figure 5(a)). A la fin de la diastole (télédiastole), le nœud sinuale

provoque un potentiel d'action et provoque l'excitation des oreillettes (ce qui correspond à l'onde P de l'électrocardiogramme (ECG) ( Figure 5 [3]). La dépolarisation des oreillettes provoque leur contraction (et l'augmentation de la pression atriale ( Figure 5 [4])) ce qui propulse une quantité additionnelle de sang dans le ventricule ( Figure 5 [5]) et permet à l'oreillette de se vider complètement ( Figure 5 cœur (b)). Cette augmentation de volume induit une augmentation rapide de la pression ventriculaire (Figure 5 [6]). La diastole du ventricule s'achève au début de sa contraction. A ce moment, la contraction de l'oreillette et le remplissage du ventricule sont terminés. Le ventricule atteint à ce moment précis son volume maximal, le volume télédiastolique, qui est en moyenne de 135 mL (Sherwood « Physiologie humaine », 3<sup>e</sup> édition, p244-246) (Figure 5 [7]).

- A la suite de l'excitation des oreillettes, l'influx traverse le nœud auriculo-ventriculaire et suit la voie de conduction spécialisée (Figure 4 a). Lorsque l'activation a gagné tout le ventricule, la contraction des oreillettes est déjà terminée. L'activation ventriculaire correspond au complexe QRS de l'ECG ( Figure 5 [8]) et précède l'augmentation de pression intraventriculaire indiquant le début de la systole ventriculaire. L'augmentation de pression provoque la fermeture de la valve auriculo-ventriculaire car la pression est alors supérieure dans les ventricules que celle dans les oreillettes ( Figure 5 [9]). La pression intraventriculaire continue alors d'augmenter ( Figure 5 [10]) sans modification du volume ( Figure 5 [11]) jusqu'à ce que la pression dépasse celle de l'aorte pour permettre l'éjection du sang, c'est ce que l'on appelle la contraction isovolumétrique ( Figure 5 [10], cœur (c)). Dès que la pression intraventriculaire dépasse la pression aortique ( Figure 5 [12]), la valve aortique s'ouvre et l'éjection du sang peut avoir lieu ( Figure 5 Cœur (d)). Le volume de sang éjecté hors du ventricule à chaque contraction est appelé volume systolique. La pression au sein de l'aorte continue d'augmenter tout au long de l'éjection du sang ( Figure 5 [13]), parallèlement à la diminution du volume ventriculaire ( Figure 5 [14]). Il est intéressant de noter que les ventricules ne se vident pas entièrement au cours de la systole, le volume de sang restant dans le ventricule à la fin de l'éjection est le volume télésystolique. Il correspond au plus petit volume ventriculaire au cours du cycle (Figure 5 [15]). La différence entre le volume de sang contenu dans le ventricule avant et après sa contraction est le volume d'éjection systolique ( $VES = VTD - VTS$ ). Ce volume d'éjection systolique est généralement exprimé par la fraction d'éjection systolique qui est de 60 à 70% pour un cœur sain, ce qui correspond à un volume télésystolique de 30% (Sherwood « Physiologie humaine », 3<sup>e</sup> édition, p244-246).
- La repolarisation des ventricules à la fin de la systole correspond à l'onde T de l'ECG (Figure 5 [16]). Cette repolarisation induit le relâchement ventriculaire provoquant une diminution de pression plus rapide à l'intérieur du ventricule qu'au sein de l'aorte (Figure 5 [17]) produisant une irrégularité, le ressaut dicrote (Figure 5 [18]) sur la courbe de pression aortique ainsi que la fermeture de la valve aortique. La pression intraventriculaire continue de décroître (Figure 5 [19]) sans modifications de volumes (Figure 5 [20], cœur (e)) jusqu'à ce que la pression au sein du ventricule soit inférieure à celle régnant au sein des oreillettes (Figure 5 [21]) provoquant l'ouverture de la valve auriculo ventriculaire permettant de nouveau le remplissage des ventricules (Figure 5 [22]) et permettant la mise en place du cycle cardiaque suivant.

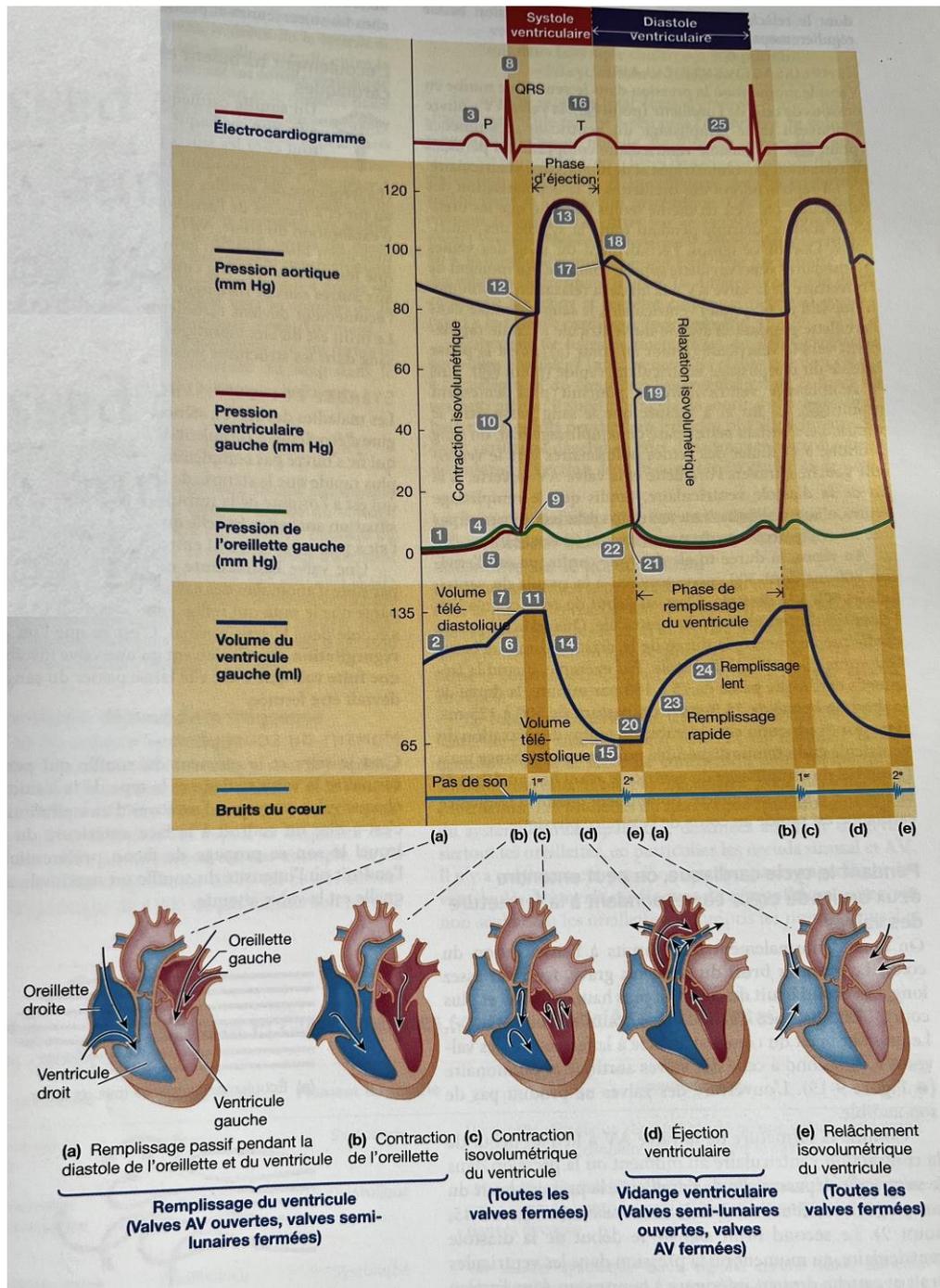


Figure 5 -Schéma détaillé d'un cycle cardiaque. (Sherwood « Physiologie humaine », 3° édition, p245).

Le débit cardiaque est le volume de sang pompé par minutes par chacun des ventricules. Pendant un intervalle de temps donné, le débit de sang traversant la circulation pulmonaire est égal à celui qui parcourt la circulation systémique. Ce débit cardiaque (Q) dépend de deux éléments : Le volume d'éjection systolique (VES) et la fréquence cardiaque (FC).  $Q = VES \times FC$ .

Bien que les deux ventricules soient tous deux des cavités musculaires et qu'en moyenne, ils éjectent simultanément la même quantité de sang, la paroi musculaire

du ventricule gauche est bien plus épaisse que celle du ventricule droit (Figure 6c). La différence morphologique des deux ventricules s'explique par les résistances inhérentes aux territoires irrigués : la circulation pulmonaire est un circuit à basse pression (20-25 mmHg près du cœur) et faible résistance à l'écoulement du sang, alors que la circulation systémique, bien plus vaste, plus résistante et à plus haute pression (120 mmHg près du cœur), oppose une résistance bien supérieure (Figure 6b) (« Chapter 7: THE CARDIOVASCULAR SYSTEM: BLOOD VESSELS AND CIRCULATION – Anatomy & Physiology » s. d.).

En effet, la résistance à l'écoulement est définie comme suit :

$$R = \frac{\eta \times L}{r^4}$$

*R* : Résistance à l'écoulement du sang

*η* : Viscosité du sang

*L* : Longueur du vaisseau

*r* : Rayon du vaisseau

La viscosité *η* est due aux frictions entre les molécules d'un fluide qui se déplacent les unes par rapport aux autres au cours de l'écoulement. La viscosité du sang est principalement due à la présence de globules rouges et dépendra donc de l'hématocrite (HTC) (mesure de la portion du sang occupée par les globules rouges exprimée en pourcentage par rapport au volume total du sang). Du fait du frottement du sang sur la paroi des vaisseaux, la résistance à l'écoulement est d'autant plus forte que la surface de contact est grande. A rayon constant, la surface dépend de la longueur des vaisseaux. Cependant, cette dernière étant globalement constante dans l'organisme, la longueur des vaisseaux n'intervient pas dans la modulation des résistances. Toutefois, la longueur artérielle systémique étant plus importante que la longueur de la circulation pulmonaire, cet élément peut en partie expliquer la différence qu'il existe entre les deux circulations. Ainsi, le principal déterminant des résistances artérielles est le rayon des vaisseaux. Une faible modification du rayon va alors causer d'importantes variations du débit car la résistance est inversement proportionnelle au rayon élevé à la puissance 4. Une diminution du rayon vasculaire de moitié va augmenter la résistance par 16, le débit sera alors diminué par 16 à pression égale (Sherwood « Physiologie humaine », 3<sup>e</sup> édition, p263-264).

Il existe en effet un lien entre la résistance vasculaire systémique et la pression artérielle moyenne par la relation :  $Q = \Delta P / R$ . Avec  $\Delta P$  correspondant à la pression artérielle moyenne ( $\Delta P$  est la différence entre la pression à l'entrée et à la sortie du réseau systémique). A l'entrée, cela correspond à la pression artérielle moyenne du sang sortant du ventricule gauche, à la sortie, à la pression dans l'oreillette droite qui est quasi nulle (proche de 0 mmHg).

On a donc :

$$PAM = Q \times R$$

*Pression artérielle moyenne = débit cardiaque x Résistance périphériques totales*

La pression artérielle moyenne correspond à la pression qui assurerait le même débit sanguin s'il n'était pas pulsatile. Elle correspond à :

$$\text{Pression artérielle moyenne} = \text{Pression diastolique} + \frac{\text{pression différentielle}}{3}$$

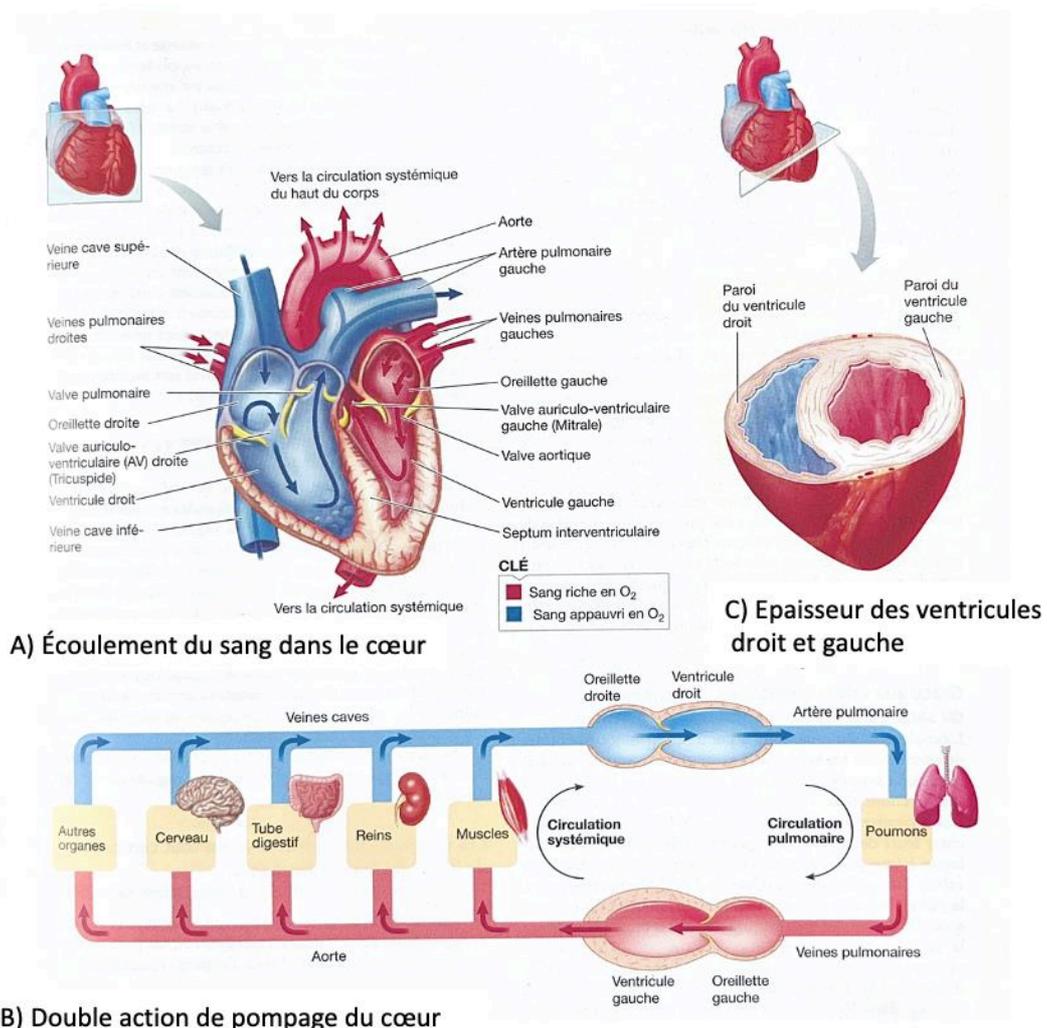
Soit 
$$PAM = PAD + \frac{(PAS - PAD)}{3}$$

Ou encore 
$$PAM = \frac{PAS + 2 \times PAD}{3}$$

*PAS* : pression artérielle systolique en mmHg

*PAD* : pression artérielle diastolique en mmHg

*PAM* : pression artérielle moyenne en mmHg



**Figure 6 – Écoulement de sang dans le cœur et action de la pompe cardiaque. a) Écoulement du sang dans le cœur b) Double action de pompage du cœur c) Épaisseur des ventricules droit et gauche.** (Sherwood « Physiologie humaine », 3<sup>e</sup> édition » p 231)

La pression artérielle est donc la résultante de la régulation cardiaque et vasculaire puisqu'elle est dépendante du débit cardiaque et des résistances périphériques totales.

Différents systèmes de régulations entrent donc en jeu, que ce soit au niveau cardiaque pour réguler le débit en jouant sur la fréquence cardiaque et/ou le remplissage ventriculaire, ou au niveau vasculaire où cette fois la régulation se fait essentiellement comme nous l'avons vu via la modification du diamètre des vaisseaux.

Ainsi, différents systèmes peuvent moduler le système cardiovasculaire (Figure 7) (Sherwood « Physiologie humaine », 3<sup>e</sup> édition, p247-249) :

- La fréquence cardiaque est essentiellement influencée par l'action du système nerveux autonome sur le nœud sinusal. Le cœur est innervé par les deux subdivisions du système nerveux autonome qui peuvent en modifier la fréquence et la force de contraction alors même qu'un stimulus nerveux n'est pas nécessaire pour déclencher la contraction. Les branches du nerf vague (pneumogastrique) du système parasympathique destinées au cœur innervent surtout les oreillettes, en particulier les nœuds sinusal et auriculo-ventriculaire. Il n'y a pratiquement pas d'innervation parasympathique des ventricules. La stimulation parasympathique diminue le rythme de la dépolarisation du nœud sino-auriculaire et réduit ainsi la fréquence cardiaque et a peu d'effets sur les ventricules.

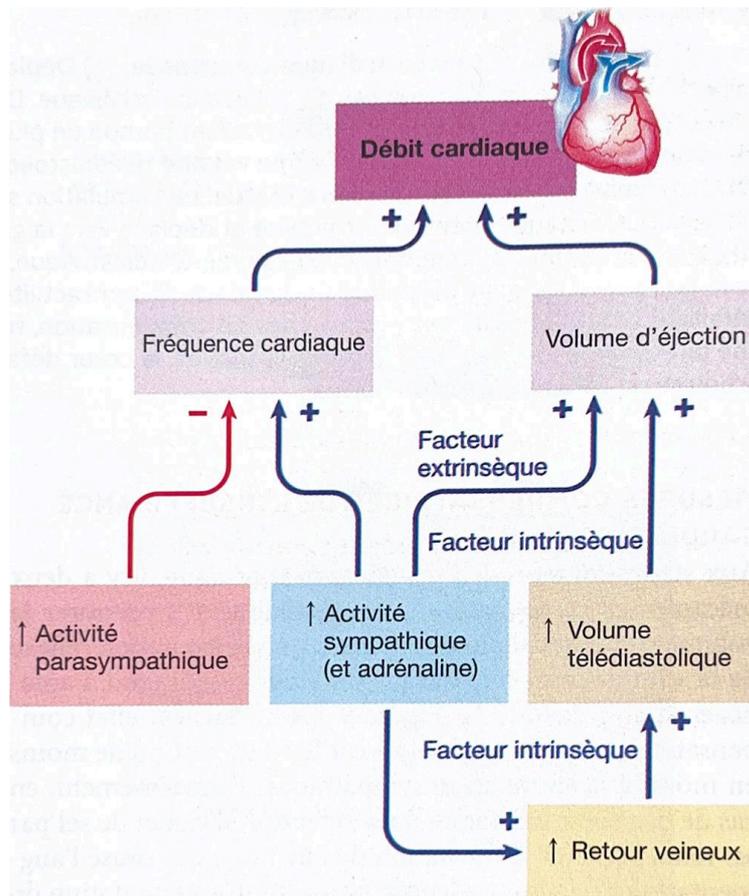
Les nerfs cardiaques du sympathique innervent les oreillettes mais également les ventricules. La stimulation sympathique augmente le rythme de la dépolarisation du nœud sino-auriculaire et augmente ainsi la fréquence cardiaque. De plus l'activation du sympathique augmente la force de contraction des oreillettes et des ventricules ce qui renforce d'autant plus son action de pompage.

C'est essentiellement le système nerveux autonome qui régule la fréquence cardiaque, toutefois, d'autres facteurs interviennent, en particulier les catécholamines, notamment l'adrénaline (hormone sécrétée par les glandes surrénales en cas de stimulation sympathique) qui renforce l'action directe du système nerveux sympathique sur le cœur.

- L'autre facteur dont dépend le débit cardiaque est le volume d'éjection systolique. Il est dépendant de deux facteurs capables d'augmenter le volume systolique par l'intermédiaire de leur effet sur la force de contraction cardiaque:
  - o Le contrôle intrinsèque lié au retour veineux, qui fait référence à la capacité inhérente du cœur à modifier son volume d'éjection. Le volume d'éjection dépend de la relation directe qui existe entre le volume télédiastolique et le volume systolique. Le contrôle intrinsèque est la conséquence de l'existence d'une relation force-longueur du muscle cardiaque. En effet, la particularité du muscle cardiaque (contrairement au muscle squelettique) est que la longueur des cellules contractiles au repos est normalement inférieure à leur longueur optimale. Par conséquent, quand leur longueur augmente et se rapproche de la longueur optimale, leur force de contraction durant la systole augmente. Cette propriété intrinsèque du cœur est connue sous le nom de loi de Franck-Starling, elle stipule que l'augmentation du retour veineux entraîne celle du volume systolique. Ainsi, lorsque l'augmentation du débit cardiaque est nécessaire, par exemple lors de l'exercice physique, le retour veineux augmente sous l'effet de la stimulation sympathique et

de l'augmentation des résistances. L'augmentation du volume télédiastolique qui en résulte entraîne automatiquement celle du volume systolique. Cet effet, en addition de l'accélération concomitante de la fréquence cardiaque contribue à l'augmentation du débit cardiaque nécessaire à l'approvisionnement en sang des muscles au travail.

- Le contrôle extrinsèque, dépendent de facteurs extérieurs au cœur dont les plus importantes sont la stimulation par les nerfs sympathiques et l'adrénaline qui augmentent la contractilité cardiaque. Cette dernière est due à l'entrée plus importante de  $\text{Ca}^{2+}$  sous l'effet de l'adrénaline et de la noradrénaline. Le  $\text{Ca}^{2+}$  supplémentaire augmente la force de contraction des fibres cardiaques grâce au renforcement de l'activité cyclique des ponts d'unions entre actine et myosine.



**Figure 7 – Facteurs déterminant le débit cardiaque.** (Sherwood « Physiologie humaine », 3<sup>e</sup> édition » p 251)

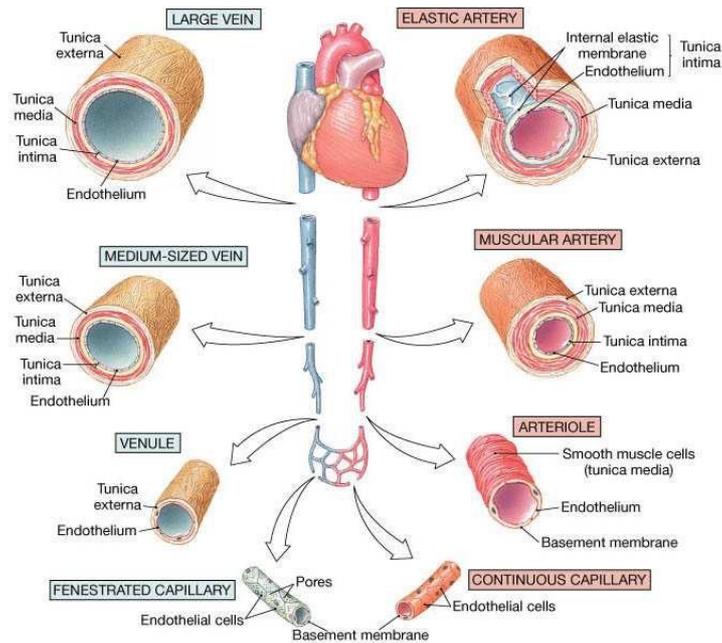
Enfin, le dernier élément de modulation de la pression artérielle n'est pas cardiaque mais vasculaire via la modulation des résistances périphériques totales. Deux phénomènes en découlent. Premièrement, la variation du rayon artériolaire va avoir un impact majeur et global sur la pression artérielle, Deuxièmement, la fraction du débit cardiaque total destiné à chaque organe peut être modulée en fonction des besoins. Le débit de chaque organe dépend ainsi de l'importance de sa vascularisation et de la résistance des artéioles locales. (voir chapitre 1.1.3)

### 1.1.3 Les vaisseaux sanguins

Les vaisseaux sanguins sont les voies de communication par lesquelles le sang circule du cœur vers les tissus, et retourne au cœur, en un circuit fermé et continu. On appelle veines les vaisseaux par lesquels le sang revient au cœur et artères ceux par lesquels il en sort.

Le système cardiovasculaire est constitué de deux circuits distincts mais liés que sont la circulation systémique et la circulation pulmonaire. Son rôle est d'assurer l'homéostasie de l'organisme en lui apportant les éléments nécessaires à son fonctionnement et en éliminant les déchets métaboliques. Ainsi, la circulation pulmonaire permet au sang pauvre en dioxygène ( $O_2$ ) et riche en dioxyde de carbone ( $CO_2$ ) sortant du ventricule droit par l'artère pulmonaire de se charger en  $O_2$  et de libérer le  $CO_2$  avant de revenir dans l'oreillette gauche par les veines pulmonaires. Le sang riche en  $O_2$  pourra alors sortir du ventricule gauche par l'aorte dans le but de perfuser les organes *via* la circulation systémique. A la différence de la circulation pulmonaire pour laquelle tout le sang traverse un seul et même organe, les poumons, la circulation systémique est faite d'une série de circulations régionales disposées en parallèle. De telle sorte qu'une partie du sang qui est pompé hors du ventricule gauche est destinée aux muscles, une autre au cerveau, etc. Le sang sortant du ventricule gauche est donc réparti de sorte que chaque territoire de l'organisme reçoit du sang oxygéné sans passer successivement d'un organe à un autre (Sherwood « Physiologie humaine », 3<sup>e</sup> édition, p230-232).

La structure de l'arborescence vasculaire est divisée en six types de vaisseaux : du côté proximal (proche du cœur) vers la périphérie se trouvent successivement les grosses artères de conductions élastiques qui se subdivisent en artères de résistances (artères musculaires puis artérioles) qui se ramifient en capillaires au contact des organes. Après avoir vascularisé les organes, le sang remonte au cœur via des veinules qui vont former les veines dont le rôle est de débarrasser les cellules des déchets métaboliques (Figure 8) (Martini 2004). La description précise de la structure des différents vaisseaux et particulièrement des différents types d'artères qui est centrale dans cette thèse sera développée dans le chapitre 1.2.

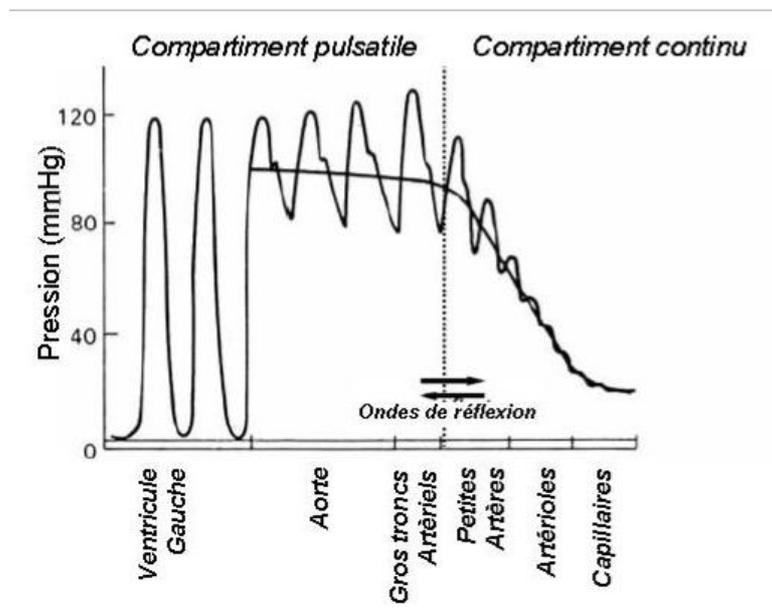


**Figure 8 - Schéma des différents types de vaisseaux sanguins en termes de diamètre et de structure.**  
(Martini 2004)

Outre sa fonction de distribution, le réseau artériel (principalement les artères proximales élastiques) qui nous intéressera plus particulièrement dans ce manuscrit possède une fonction supplémentaire majeure : le lissage du flux et du débit sanguins qui sont pulsatiles en sortie du cœur. En effet, la structure des parois des grosses artères leur confère des propriétés physiques élastiques capables de lisser les fortes fluctuations de débit et de pression sanguins générées au cours du cycle cardiaque, vers un flux sanguin continu et de plus basse pression nécessaire pour être compatible avec la fragilité des plus petits vaisseaux et pour permettre les échanges au niveau des organes. Ce phénomène est appelé « effet Windkessel ». En effet, les parois élastiques des gros troncs artériels comme l'aorte sont capables de résister à la forte pression d'éjection d'un important volume sanguin par le cœur. Sous l'effet de cette forte pression, la paroi artérielle (et en particulier les fibres élastiques qu'elle contient) va se distendre et accumuler de l'énergie qu'elle pourra restituer de manière passive en diastole lorsque le cœur ne sera plus contracté permettant de maintenir une force motrice responsable de l'écoulement du sang. Pendant l'éjection ventriculaire, le volume de sang entrant dans le réseau vasculaire est supérieur à celui qui en sort par les plus petits vaisseaux à l'autre extrémité en raison de la résistance à l'écoulement des artérioles. L'élasticité des artères leur permet de se laisser distendre temporairement par le sang éjecté et de stocker dans leur paroi étirée une partie de l'énergie de pression fournie par la contraction ventriculaire. Pendant la diastole, l'éjection du sang dans les artères cesse et les parois artérielles reviennent sur elles-mêmes, ce retrait des parois exerce une pression sur le sang contenu dans les artères et le pousse vers l'aval ce qui assure la continuité du débit du sang vers les tissus au long du cycle cardiaque. Les artères musculaires et particulièrement les artérioles, quant à elles, contribuent à répartir le flux sanguin entre les différents organes en fonction des besoins et à lisser le flux sanguin. Cela est rendu possible par leurs importantes propriétés vasomotrices (vasoconstriction et vasorelaxation) régulées par

des processus neuro-hormonaux. Les artérioles sont les principaux vaisseaux résistifs du réseau vasculaire. Par opposition à la faible résistance des artères, l'importante résistance des artérioles cause une forte chute de pression. En moyenne, la pression artérielle moyenne tombe de 93mmHg à la sortie de l'aorte à 30-35 mmHg à la sortie des artérioles (et donc à l'entrée des capillaires ce qui va permettre un échange optimal au niveau des capillaires). Le rayon et par conséquent la résistance des artérioles peuvent être ajustés dans chaque organe indépendamment, ce qui est important à la fois pour la distribution optimale du débit cardiaque entre les différents organes et en fonction des besoins de l'organisme à un moment donné mais également pour la régulation de la pression artérielle. (Sherwood « Physiologie humaine », 3<sup>e</sup> édition, p269-271)

Ainsi, le volume de sang présent dans l'artère au moment de la diastole continue à être propulsé par la compression dues aux artères élastiques restituant l'énergie emmagasinée, permettant le maintien d'une pression élevée, et la résistance artériolaire permet un lissage du flux sanguin aboutissant à la transformation d'une pression et d'un flux pulsatile à la sortie du cœur en une pression et un flux moins discontinus dans les grosses artères, puis qui deviendront progressivement plus basse et continu dans les artères périphériques à proximité des organes (Figure 9) (Safar et Boudier 2005; Faury 2001a, Sherwood « Physiologie humaine », 3<sup>e</sup> édition, p265-267).



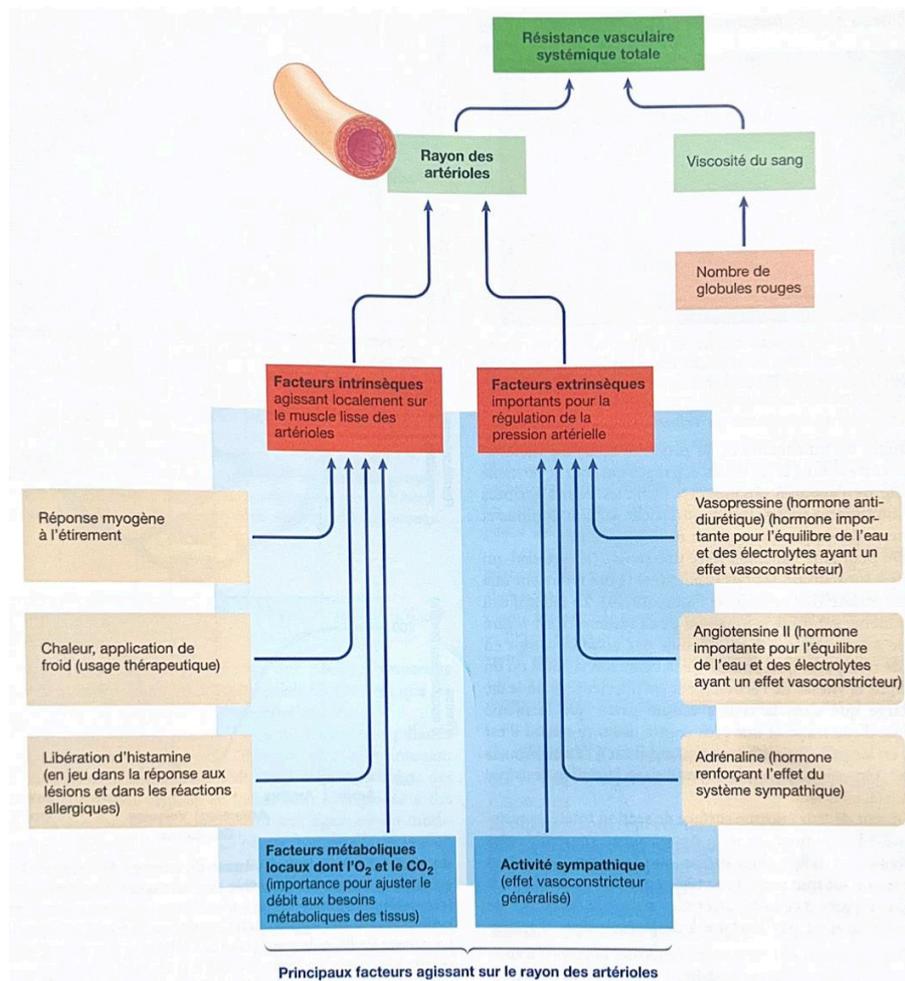
**Figure 9 - Représentation schématique de la pression artérielle moyenne le long de l'arbre vasculaire. Reflet de la transformation de pression pulsatile proximale en pression distale continue. (Safar et Boudier 2005)**

Comme cela a été décrit plus haut, le contrôle local du rayon artériolaire est essentiel non seulement pour permettre l'obtention d'un flux sanguin continu au niveau des organes mais également pour permettre la modulation et la répartition du débit cardiaque et donc pour la régulation de la pression artérielle. Cette caractéristique des artères musculaires est liée aux propriétés vasomotrices de la paroi de ces vaisseaux. La paroi de ces vaisseaux contient en effet peu de fibres conjonctives contrairement à celle des artères mais contient une épaisse couche de muscle lisse richement innervée par des fibres sympathiques. Le muscle lisse est également capable de répondre à de nombreux stimuli chimiques ainsi qu'à des hormones circulantes. Il est disposé de

façon circulaire dans la paroi de sorte que sa contraction réduit la circonférence et le rayon du vaisseau, augmentant ainsi la résistance à l'écoulement du sang. Ce phénomène est appelé vasoconstriction. A l'inverse, on appelle vasodilatations l'augmentation de la circonférence et de rayon d'un vaisseau due au relâchement du muscle lisse de sa paroi (entraînant une diminution de la résistance du vaisseau et facilitant l'écoulement du sang).

C'est par l'intermédiaire de facteurs locaux, intrinsèques, agissant sur le muscle lisse des artéioles et modifiant donc la résistance artériolaire que se fait l'ajustement des débits régionaux. Ces facteurs locaux sont de nature physique ou chimique (Figure 10) (Sherwood « Physiologie humaine », 3<sup>e</sup> édition, p269-275) :

- Les facteurs chimiques dont dépend le rayon des artéioles, comportent des modifications métaboliques locales et/ou la libération de messagers chimiques d'action locale (par exemple le monoxyde d'azote ou l'histamine)
- Les facteurs physiques comportent l'application de chaleur ou de froid et la réponse myogène à l'étirement (le muscle lisse artériolaire répond à l'étirement passif en augmentant son activité myogène ce qui s'oppose à l'étirement passif initial. Inversement, la diminution de l'étirement cause la diminution du tonus myogène.)
- Enfin, l'un des mécanismes le plus important dans la régulation de la pression artérielle est le contrôle sympathique extrinsèque du rayon des artéioles, ces facteurs extrinsèques sont nerveux (système sympathique) et/ou hormonaux. Les centres cardiovasculaires situés dans le bulbe rachidien sont les principaux responsables de l'activité sympathique destinée aux artéioles. Il s'agit de centres intégrateurs pour la régulation de la pression artérielle. D'autres régions de l'encéphale agissent sur la distribution du débit cardiaque, notamment l'hypothalamus où sont situés des centres de la thermorégulation responsables des modifications du débit cutané qui contrôlent les pertes de chaleur vers l'environnement.
- Les artéioles sont également soumises à l'influence de plusieurs hormones circulantes dont l'adrénaline sécrétée par la médullosurrénale, qui renforce l'action du système sympathique dans la plupart des organes. D'autres hormones agissent par le contrôle de l'équilibre hydroélectrique : l'hormone antidiurétique (ou vasopressine) (cette hormone s'oppose à la perte d'eau par les reins au cours de la formation d'urine) et l'angiotensine II qui fait partie du système hormonal rénine/angiotensine/aldostérone, fondamental pour la conservation du sel au cours de la formation d'urine et par conséquent la conservation de l'eau puisque le sel est le principal facteur de la pression osmotique du liquide extra cellulaire.



**Figure 10 - Principaux facteurs déterminant la résistance vasculaire périphérique (systémique) totale.** (Sherwood « Physiologie humaine », 3<sup>e</sup> édition » p 275)

Comme cela a été décrit plus haut, le système cardiovasculaire est vital pour l'organisme, à tel point que, selon l'organisation mondiale de la santé (OMS) les atteintes cardiovasculaires restent la principale cause de décès au niveau mondial sur les décennies 2000-2019 (« The Top 10 Causes of Death » s. d.). Cela s'explique par le fait que le cœur et les vaisseaux sanguins sont soumis à de fortes contraintes, qui génèrent des altérations moléculaires nombreuses qui peuvent conduire à différents types de pathologies. Premièrement, ces altérations peuvent être de nature mécanique. En effet, si l'on suppose une fréquence de contraction moyenne de 75 par minute, un cœur humain se contracte environ 108 000 fois en 24h, plus de 39 millions de fois en un an et près de 3 milliards de fois au cours d'une vie de 75 ans. Cette répétition de cycles d'extension/rétraction génère de fortes contraintes qui finissent par provoquer des cassures moléculaires dans les composants cellulaires ou extracellulaire de la paroi artérielle. Ces altérations peuvent également avoir une origine enzymatique *via* l'action d'enzymes protéolytiques. L'altération du système cardio-vasculaire et plus spécifiquement l'altération du réseau artériel et ses conséquences fera l'objet du chapitre 3. Le bon fonctionnement du réseau artériel est essentiel pour préserver un organisme en bonne santé, et est dépendant de sa

structure, que nous allons détailler. L'altération des fibres élastiques joue un rôle majeur dans l'apparition des troubles vasculaires et la protection, la production ou la réparation de ces fibres sont la clé de voute de ce travail de thèse (Fhayli, Boëté et al. 2019).

## 1.2 Structure des artères

La paroi de toutes les artères, qu'elles soient de conduction ou de résistance, sont composées de façon similaire de trois tuniques cylindriques disposées de façon concentrique : l'intima, la média et l'adventice, respectivement depuis la partie luminale vers l'extérieur du vaisseau (Figure 11). C'est la variation de la quantité des différents composants de la paroi ainsi que de leur organisation structurale qui détermine la fonction de chaque type d'artère.

L'intima est la structure artérielle en contact direct du sang. Elle se compose d'un épithélium pavimenteux simple composé d'une monocouche de cellules endothéliales appelé endothélium reposant sur une lame basale riche en collagène (essentiellement de type IV) en protéoglycanes et en glycoprotéines comme les lamines (Yurchenco et O'Rear 1994). La membrane basale permet de lier l'endothélium au tissu conjonctif sous-jacent, elle est perméable permettant aux éléments présents dans le sang de la traverser. ((« Chapter 7: THE CARDIOVASCULAR SYSTEM: BLOOD VESSELS AND CIRCULATION – Anatomy & Physiology » 2020).

La média est la tunique centrale, généralement la plus épaisse. Elle est composée d'une alternance de lames élastiques concentriques et de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) lui procurant ses capacités vasomotrices de régulation des résistances et de redistribution du flux sanguin en augmentant et diminuant le diamètre artériel en réponse à différents stimuli. Dans les moyennes et les grosses artères élastiques, la média est délimitée par deux lames élastiques : les limitantes élastiques interne (coté intima) et externe (coté adventice) (Figure 11). Les lames élastiques sont constituées d'un macro-polymère élastique appelé élastine qui assure les propriétés élastiques des vaisseaux. Les lames élastiques sont séparées par une région composée de CMLVs, de fines fibres élastiques, de collagène (principalement de types I et III) et de protéoglycanes (Davis 1993; Dingemans et al. 2000; Howard et Macarak 1989; O'Connell et al. 2008). Une couche de cellules musculaires lisses vasculaires et la lame élastique adjacente constituent l'unité fonctionnelle de la paroi des artères élastiques : l'unités lamellaires. Chez la plupart des animaux, le nombre de lames élastiques est fonction de la pression artérielle et du diamètre de l'artère. Le nombre de lames élastiques est tel que la tension qui s'exerce par unité lamellaire soit un paramètre relativement constant par les différentes espèces compris entre 1 et 3 Pa. Ainsi, la proportion d'élastine et de CMLVs est optimale face au niveau de stress auquel les différentes artères sont soumises et le nombre d'unités lamellaires diminuent le long de l'arbre artériel. Chez l'Homme adulte, on dénombre entre 70 et 80 unités lamellaires dans l'aorte ascendante et entre 25 et 30 dans l'aorte abdominale (Mylène Pezet et al. 2008a; Wolinsky et Glagov 1967). Chez la souris on compte 5 à 10 unités lamellaires dans l'aorte ascendante tandis que les petites artères musculaires proches de la périphérie (comme l'artère mésentérique) en possèdent 3 unités ou moins, voir uniquement les limitantes élastiques interne et externe pour

certaines vaisseaux (Figure 12) (Cocciolone et al. 2018; Wolinsky et Glagov 1967; Wolinsky 1970)

Enfin, la tunique la plus externe est l'adventice. C'est une gaine riche en fibroblastes, fibrocytes et une matrice riche en fibres de collagène, très résistante, qui protège le vaisseau en empêchant les distensions trop importantes qui pourraient être engendrées par la pression sanguine. L'adventice est toutefois absente des plus petites artères musculaires. Du fait de la cinétique du flux sanguin et de l'épaisseur de la paroi dans les grosses artères, les échanges moléculaires entre le sang et les différentes cellules de la paroi sont insuffisants. C'est pourquoi les vaisseaux de grand calibre contiennent un réseau de petits vaisseaux disséminés dans l'adventice appelé *vasa vasorum*, qui assure aux cellules vasculaires un apport en gaz et en nutriments suffisant ainsi que l'élimination des déchets métaboliques (Cocciolone et al. 2018), « Chapter 7: THE CARDIOVASCULAR SYSTEM: BLOOD VESSELS AND CIRCULATION – Anatomy & Physiology » 2020).

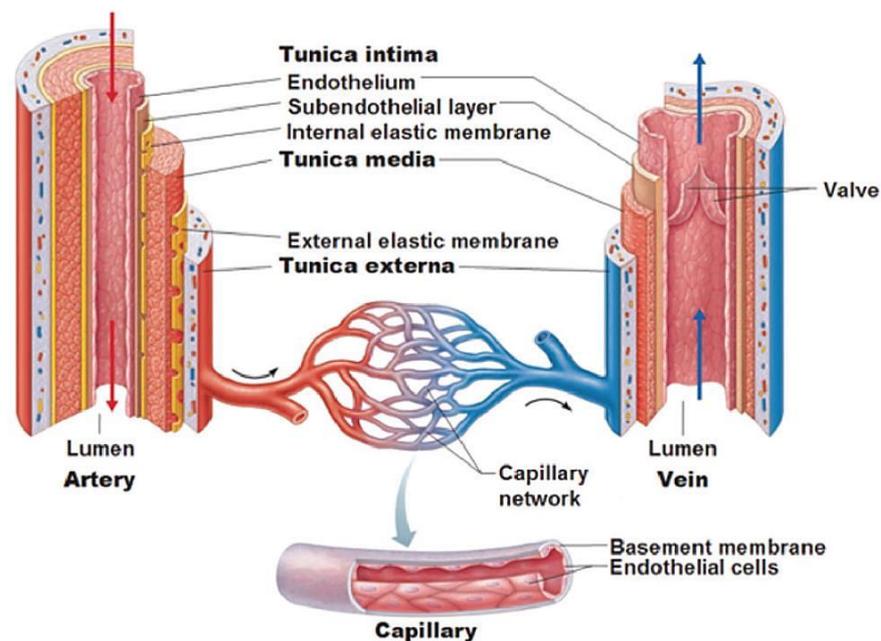
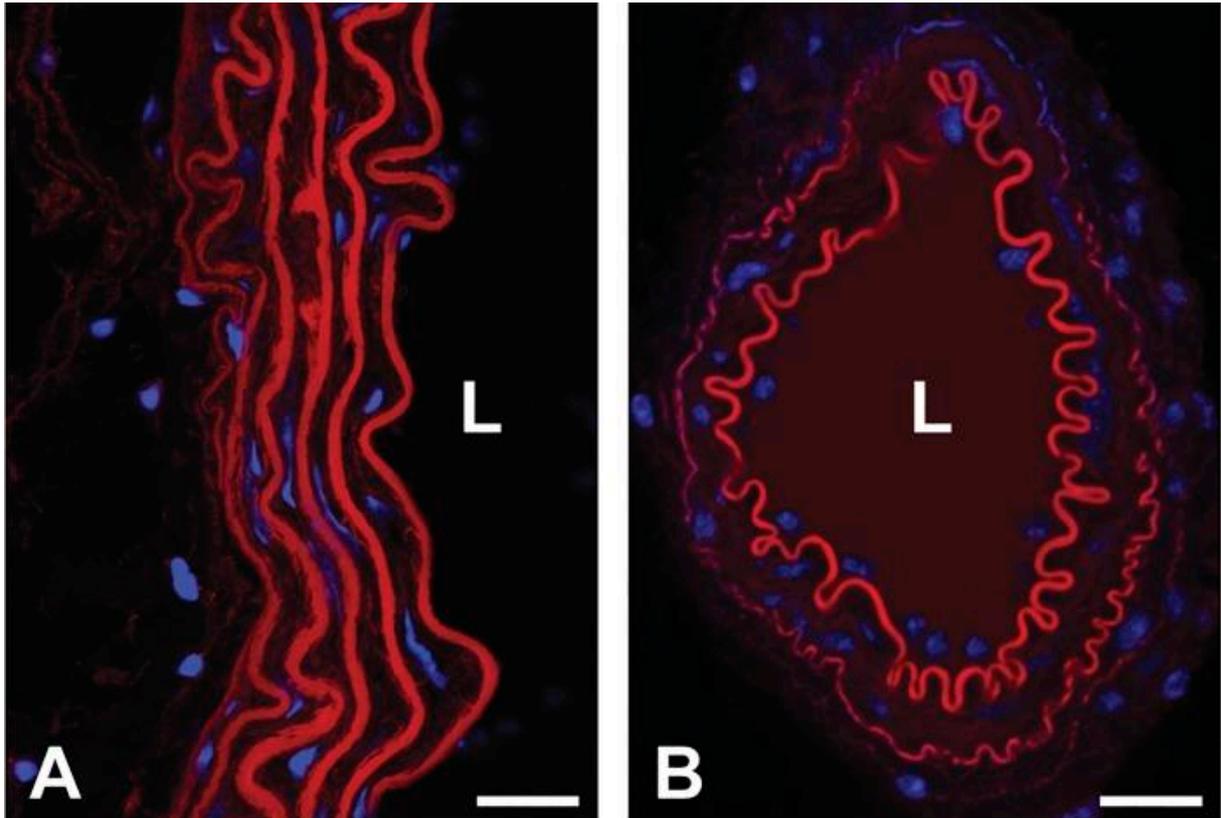


Figure 11 - Structure des vaisseaux sanguins (Elliott et Gerecht 2016)

Bien que la structure artérielle soit identique pour la grande majorité des vaisseaux sanguins, c'est la composition qui évolue et qui prodigue aux différents types de vaisseaux leurs propriétés. La paroi des artères de conduction comme l'aorte, possède plus de tissu élastique et peu de tissu musculaire. En effet, son rôle est de résister aux importantes forces mécaniques générées par les ventricules mais elles n'ont que peu de rôle de régulation des résistances et du flux sanguin. La paroi des artères musculaires, quant à elle, compte d'avantages de cellules musculaires lisses, lui donnant la capacité de moduler le flux sanguin. Les capillaires ont une paroi très fine, leur permettant d'assurer les échanges entre le sang et les cellules des organes irrigués. Enfin, la paroi des veines est plus mince que celle des artères du fait de la faible pression s'exerçant au sein du réseau veineux. Le retour veineux est parfois favorisé par la présence de valves pour éviter le reflux du sang par gravité (« Chapter 7: THE CARDIOVASCULAR SYSTEM: BLOOD VESSELS AND CIRCULATION – Anatomy & Physiology » 2020).



*Figure 12 - Organisation des lames élastiques en fonction de la taille des artères. Des coupes transversales d'une aorte descendante (A) et d'une artère mésentérique (B) de souris colorées pour l'élastine (rouge) et les noyaux cellulaires (bleu) sont présentées. L'aorte descendante possède plusieurs unités lamellaires. L'artère mésentérique possède une lame élastique interne à la surface luminale et une fine lame élastique externe à la surface adventitielle. L, lumière. Barres d'échelle = 20  $\mu\text{m}$ . (Cocciolone et al. 2018)*

### 1.2.1 Les cellules

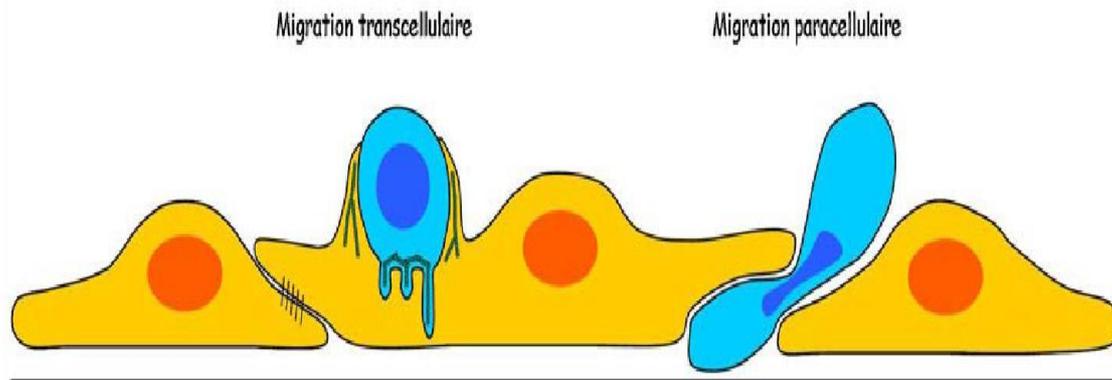
La paroi vasculaire est composée de matrice extracellulaire et de trois types de cellules majoritaires : les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses vasculaires et les fibroblastes.

#### 1.2.1.1 Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sont à l'interface entre les éléments circulants du sang et la paroi vasculaire. L'assemblage de cellules endothéliales en monocouche sur toute la surface interne des vaisseaux forme ce que l'on appelle l'endothélium vasculaire. Les cellules endothéliales reposent sur une membrane basale riche en collagènes et en glycoprotéines.

L'espacement entre deux cellules endothéliales est très variable le long de l'arborescence vasculaire ce qui va lui permettre de réguler au mieux le passage de micro et macro molécules nécessaires à l'homéostasie de l'organisme entre le sang et la paroi vasculaire. Cela va lui permettre d'assurer l'une de ses fonctions premières : celle de barrière semi-perméable aux différents éléments présents dans le sang circulant. Le passage à travers la membrane endothéliale peut être transcellulaire ou paracellulaire (Figure 13). Les petites molécules sortent de la circulation sanguine de façon passive par passage paracellulaire tandis que les cellules et les macromolécules traversent la barrière endothéliale par voie transcellulaire, essentiellement via des

vésicules d'endocytose/exocytose ou par le biais de récepteurs spécifiques (Komarova et al. 2017).



*Figure 13 -Schéma du passage transcellulaire et paracellulaire à travers la barrière endothéliale. (Weiss et al. 2009)*

Les jonctions entre les cellules endothéliales se présentent sous différentes formes leur permettant de réguler l'adhérence intercellulaire, ce qui contribue au contrôle de la perméabilité endothéliale, mais joue également un rôle dans diverses fonctions comme la signalisation cellulaire. Il existe 3 types de structures jonctionnelles (Figure 14) (Komarova et al. 2017) :

- Les interactions de type jonctions serrées (tight junction), également appelées jonctions étanches, permettent de créer une barrière entre deux cellules endothéliales adjacentes assurant le contrôle des échanges entre le sang et les tissus. Elles sont médiées par des protéines d'adhésion telles que les claudines, l'occludine et les molécules d'adhésion jonctionnelles (JAM), tandis que les protéines de la zona occludine (ZO-1, ZO-2 et ZO-3) relient les molécules d'adhésion au cytosquelette d'actine. Le nombre de jonctions serrées et donc l'efficacité de sa fonction barrière change dans les différents lits vasculaires en fonction des exigences spécifiques des organes et des tissus. Ainsi, dans certains organes comme le cerveau, les cellules endothéliales forment des barrières très restrictives (barrière hémato-encéphalique). C'est également le cas au niveau des artères de conductions. Tandis que dans d'autres organes comme le rein mais également dans les capillaires sanguins, où l'échange entre le sang et le tissu doit être optimal, les cellules endothéliales forment une barrière semi-perméable permettant l'échange rapide de solutés et de molécules (Cong et Kong 2020; Simionescu, Simionescu, et Palade 1975).
- Les liaisons de type jonctions d'adhérence sont composées des cadhérines de l'endothélium vasculaire (VE-cadhérine et VE-cadhérine-2) et des  $\beta$ - et p120-caténines associées. L' $\alpha$ -caténine se lie à la  $\beta$ -caténine pour connecter les jonctions d'adhérence au cytosquelette d'actine (Figure 14). Ces jonctions contribuent au contrôle de la perméabilité endothéliale et permettent également l'assemblage et le maintien des jonctions serrées (Komarova et al. 2017). En effet, des études sur des animaux KO pour la  $\beta$ -caténine montre que l'absence

de cette molécule induit une régulation négative des claudines-1 et -3 nécessaires à la structure des jonctions serrées provoquant dans le cadre de cette étude une rupture de la barrière hémato-encéphalique (Tran et al. 2016). Les principales protéines des jonctions adhérentes sont les VE cadhérines. Outre leur fonction d'adhérence, ces protéines jouent également un rôle au cours du développement artériel en participant à la reconnaissance spécifique cellule/cellule endothéliale au cours de l'assemblage des structures vasculaires en développement et dans le maintien de la structure et la fonction des vaisseaux établis (Breier et al. 1996). Une étude a également montré le rôle de la VE-cadhérine-2 dans le maintien de la structure et la fonction de la paroi vasculaire. En effet des souris KO pour la VE-cadhérine-2 présentent une altération des fibres élastiques avec l'apparition de fibres élastiques radiales reliant entre elles deux lames élastiques concentriques successives. De plus, cette modification génétique provoque une augmentation du diamètre interne artériel, une augmentation de la tension circonférentielle de la paroi ainsi qu'une diminution de la pression artérielle (Philibert et al. 2012)

- Les interactions de type gap junctions sont composés de 2 hexamères de connexine formant des « héli-canaux » entre deux cellules endothéliales adjacentes délimitant un pore central permettant l'échange d'ions et de molécules hydrosolubles de bas poids moléculaire (<1kDa) entre cellules voisines (Komarova et al. 2017). Les gaps junctions présentent également un rôle dans la régulation du tonus vasculaire dans la circulation systémique puisque la délétion de certaines connexines provoque des effets divers sur la pression artérielle. En effet, la délétion de la connexine Cx43 provoque une hypotension (Liao et al. 2001) alors que la délétion de Cx40 entraîne une hypertension associée à une dérégulation du système rénine (Krattinger et al. 2007; Wagner et al. 2007).

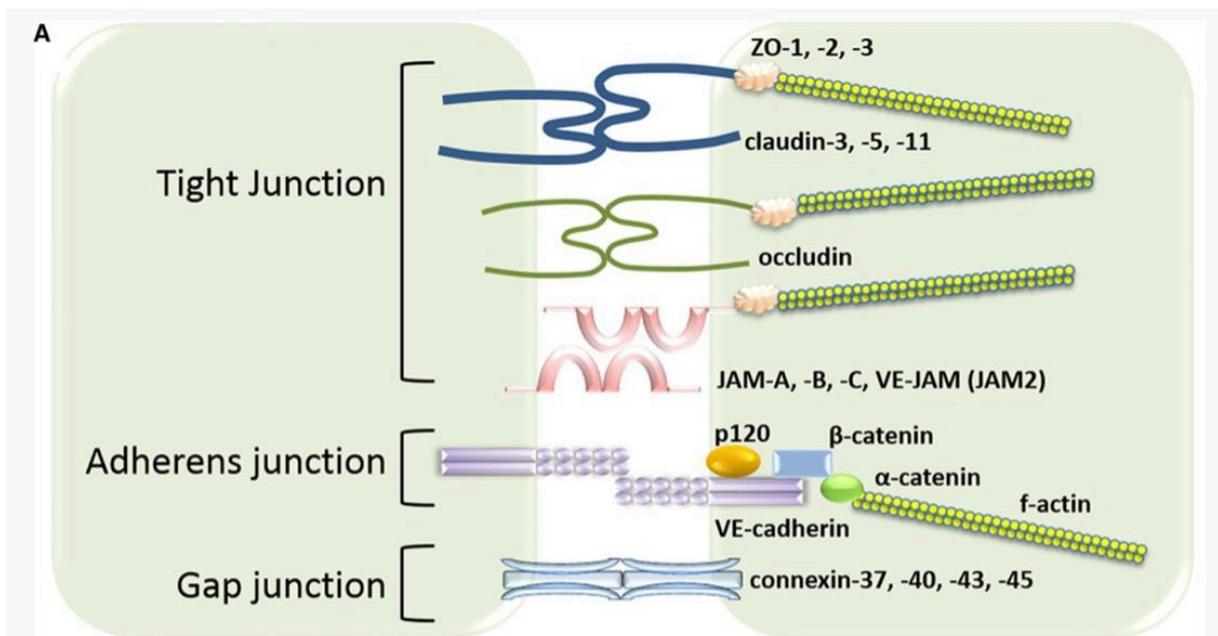


Figure 14 – Représentation schématique de la composition des jonctions inter-endothéliales. (d'après Komarova et al. 2017)

L'endothélium a longtemps été cantonné à la seule fonction de barrière semi-perméable. Pourtant son rôle est bien plus vaste et complexe que cela. En effet, les cellules endothéliales jouent un rôle dans la régulation du tonus vasomoteur, sous l'influence de facteurs physiques et chimiques qui proviennent soit de la lumière vasculaire, soit des tissus environnants. L'endothélium libère des substances vasodilatatrices comme le monoxyde d'azote (NO), la prostacycline ou prostaglandine I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) et des médiateurs vasoconstricteurs comme l'endothéline (ET) et le platelet activating factor (PAF) (Aitoufella et al. 2008).

La production de NO (principal agent vasorelaxant d'origine endothéliale par l'endothélium est constitutive et modulée par différents stimuli alors que la synthèse des autres médiateurs (PGI<sub>2</sub>, ET et PAF)) est seulement inductible. Après sa production, le NO diffuse vers les cellules musculaires lisses adjacentes où il active sa cible principale qui est la guanylate cyclase soluble. Cette dernière produit, à partir du GTP, le GMPc responsable d'une cascade physiologique impliquée dans la relaxation des cellules musculaires lisses induisant la vasodilatation (Alapa et al. 2021). Une anomalie de production ou de régulation du NO définit ce que l'on appelle une dysfonction endothéliale. Cette dysfonction est fréquente dans les pathologies vasculaires comme l'athérosclérose ou l'hypertension artérielle et constitue une complication du syndrome d'apnées obstructives du sommeil (Lévy et al. 2015) (voir chapitre 3.2.5).

Les cellules endothéliales jouent également un rôle dans l'hémostase puisqu'elles participent à l'activation plaquettaire en sécrétant le facteur de von Willebrand (protéine favorisant l'adhésion et l'agrégation des plaquettes) et qu'elles produisent des facteurs de la cascade de la coagulation (facteur tissulaire), et du système fibrinolytique via la sécrétion de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA), protéase qui transforme le plasminogène en plasmine. L'endothélium aurait également une fonction dans l'immunité. A la fois dans l'immunité innée en régulant le trafic des leucocytes circulants depuis le compartiment sanguin vers le compartiment tissulaire mais également dans l'immunité adaptative en agissant comme cellules présentatrices d'antigène (Aitoufella et al. 2008).

Enfin, bien qu'il soit généralement admis que les CMLVs sont les principales cellules productrices d'élastine dans la paroi vasculaire (Giro et al. 1984; Ruckman et al. 1994), des études récentes ont montré que les cellules endothéliales sont nécessaires à la production de la limitante élastique interne (LEI) à *minima* dans les artères musculaires/de résistance. En effet, l'équipe de Lin *et al.* ont utilisé le système Cre/LoxP pour générer des souris avec une délétion spécifique d'Eln dans les CE ou les CMLVs et ont évalué l'effet de la perte d'élastine spécifique des cellules sur la structure artérielle. Leurs résultats suggèrent que l'élastine dérivée des CE est suffisante pour la production d'une limitante élastique interne le long de la majeure partie de l'arbre vasculaire, tandis que dans l'aorte ascendante, l'élastine dérivée des CMLVs est nécessaire pour l'intégrité de la LEI. Il existerait donc un gradient dans lequel les CMLVs sont principalement nécessaires à la production d'une LEI fonctionnelle dans les artères élastiques proximales, tandis que les CE sont principalement responsables de la LEI dans les artères musculaires/de résistance. Cependant, il est probable que les CE et les CMLVs contribuent toutes deux à la production de la LEI dans les deux régions. (Halabi et Kozel 2020; Lin et al. 2019).

### 1.2.1.2 Cellules musculaires lisses vasculaires

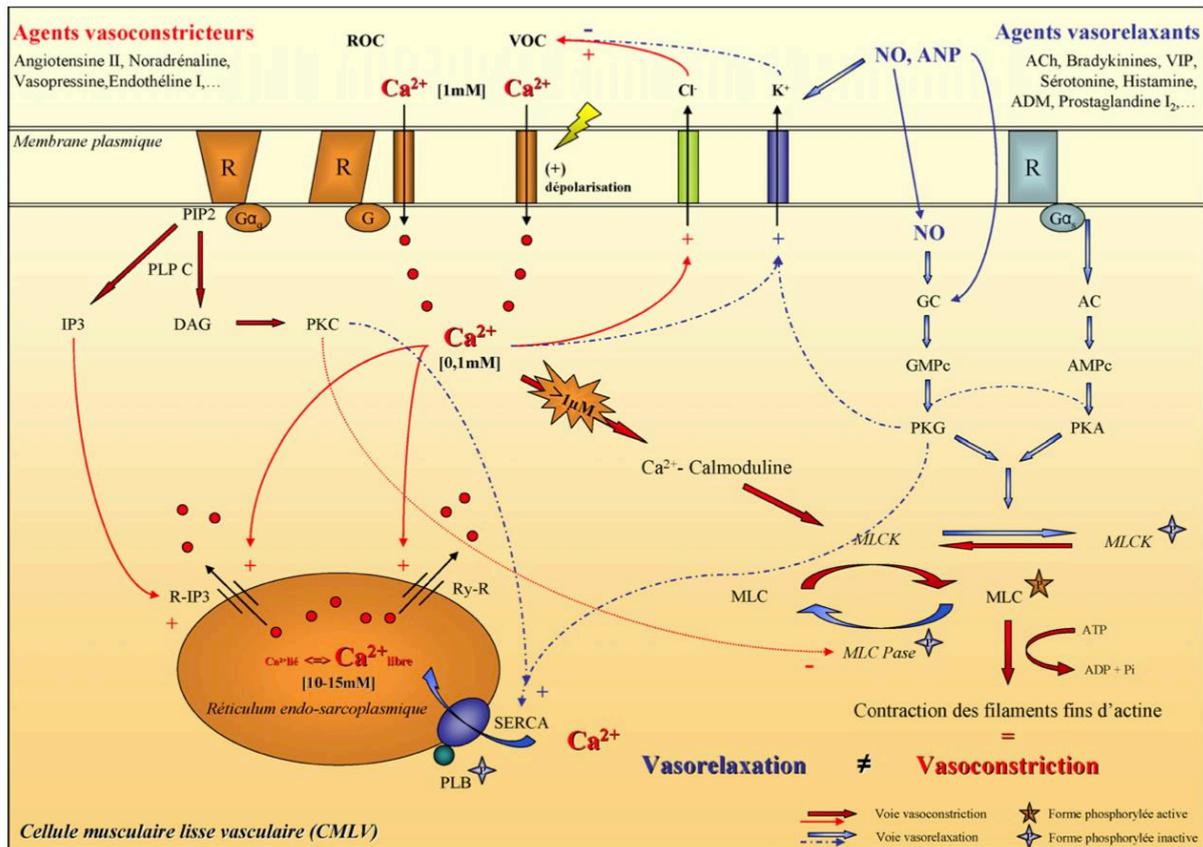
Les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) sont généralement fusiformes et arrangées dans la paroi des vaisseaux de manière concentrique sous forme de feuillets associés à une charpente de matrice extracellulaire (MEC) sous la forme de lames élastiques et de fibres de collagène. Les CMLVs sont les principaux éléments contractiles de la paroi, ils sont appelés muscles lisse par opposition au muscle strié squelettique du fait de l'absence de stries caractéristiques de ce dernier. En comparaison des cellules musculaires squelettiques, les CML sont de petite taille, uninucléés, lente mais très résistante à la fatigue (Matsumoto et Nagayama 2012). Leur fonction consiste à produire une tension active (par opposition à la tension passive générée par les fibres élastiques), par leur vasomotricité (contraction / relaxation) sous contrôle physiologique, changeant ainsi le diamètre du vaisseau, principal vecteur de la résistance à l'écoulement comme nous l'avons vu précédemment. La vasoconstriction de la cellule musculaire lisse vasculaire résulte de l'augmentation de calcium dans la cellule via l'action de deux systèmes dépendants et synergiques (Figure 15) (Collin et Levy 2008) :

- L'action de ligands neuronaux ou hormonaux tels que l'angiotensine II ou la noradrénaline via leur récepteurs membranaires spécifiques sur la cellule musculaire lisse (récepteurs couplés à une protéine G). Ce qui va déclencher une cascade enzymatique mettant en jeu dans la grande majorité des cas la phospholipase C.
- La modification du potentiel de membrane. En effet, une dépolarisation de la membrane des CMLVs induit l'ouverture des canaux calciques voltages dépendants et l'entrée du calcium extracellulaire dans la CMLV. La concentration de calcium intracytoplasmique va alors se complexer à différentes molécules dont la calmoduline. Le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmoduline ainsi formé active alors une protéine kinase, la « myosin light chain kinase », responsable de la phosphorylation et ainsi de l'activation des chaînes légères de myosine permettant la contraction des filaments d'actine et ainsi la contraction du muscle lisse vasculaire.

De façon opposée, la relaxation de la CMLV résulte de la diminution de la concentration de calcium intracytoplasmique soit par l'expulsion du calcium à l'extérieur de la cellule, soit par son recaptage dans le réticulum endosarcoplasmique. Plusieurs mécanismes peuvent être mis en jeu (Figure 15) (Collin et Levy 2008) :

- Certains médiateurs, comme le NO, le peptide natriurétique atrial ou l'acétylcholine, entraînent l'augmentation de guanosine monophosphate cyclique et d'adénosine monophosphate cyclique (GMPc et AMPc) par l'action de la guanylate cyclase et de l'adénylate cyclase responsables d'une cascade physiologique (principalement de phosphorylation via des protéines kinases) impliquée dans la relaxation des cellules musculaires lisses induisant la diminution de la contraction cytoplasmique de calcium et ainsi la vasodilatation.
- La diminution du calcium intracytoplasmique peut également être due à l'efflux du calcium par stimulation des ATPases- $\text{Ca}^{2+}$  dépendantes de la membrane plasmique, de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  ou par l'activation des canaux potassiques ATP et calcium-dépendants. En effet, la phosphorylation de ces derniers provoque une hyperpolarisation membranaire qui inhibe l'entrée du calcium via les canaux calciques voltage-dépendants (Collin et Levy 2008).

La manifestation la plus importante de cette propriété se situe au niveau des artères musculaires et des artérioles, qui peuvent se contracter de manière différenciée suivant les territoires, ce qui permet une distribution du flux sanguin ciblée et localisée, en fonction des besoins des différents organes ainsi que la modulation de la pression artérielle. Dans les grosses artères élastiques proportionnellement plus pauvres en CMLV au profit des lames élastiques, la réponse physiologique aux substances vasoactives joue un rôle moins important dans le contrôle de la distribution du sang.



**Figure 15 - Mécanismes de la contraction de la cellule musculaire lisse vasculaire (CMLV).** AC : adénylate cyclase ; ACh : acétylcholine ; ADM : adrénomédulline ; ADP : adénosine diphosphate ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; ANP : peptide natriurétique atrial ; ATP : adénosine triphosphate ; DAG : diacylglycerol ; Gαq : protéine G/sous-unité alpha de type q ; Gαs : protéine G/sous-unité alpha de type s ; GC : guanylate cyclase ; GMPc : guanidine monophosphate cyclique ; IP3 : inositol trisphosphate ; MLC : chaîne légère de myosine (Myosine Light Chain) ; MLCK : kinase de la chaîne légère de myosine (Myosine Light Chain Kinase) ; NO : monoxyde d'azote ; Pi : phosphate inorganique ; PIP2 : phosphatidylinositol bisphosphate ; PKA : protéine kinase A ; PKG : protéine kinase G ; PKC : protéine kinase C ; PLB : phospholamban ; R : récepteur couplé à une protéine G ; R-IP3 : récepteur à l'IP3, ROC : canaux récepteur-dépendants (Receptor Operated Channels) ; Ry-R : récepteur à la ryanodine ; SERCA : pompes de recapture du calcium cytoplasmique (Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium ATPases) ; VIP : peptide inhibiteur vasoconstriction (Vasoactive Inhibitor Peptide) ; VOC : canaux voltage-dépendants (Voltage Operated Channels). (Collin et Levy 2008)

En fonction des conditions mais également de leur environnement, les cellules musculaires lisses sont capables de transiter entre deux états : un phénotype synthétique et prolifératif durant le développement embryonnaire ou au cours du processus de réparation vasculaire et un phénotype plus quiescent et contractile dans les vaisseaux matures. Ces deux phénotypes sont très différents d'un point de vue

fonctionnel : La fonction du phénotype synthétique et prolifératif est exclusivement dédiée à la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire et à la prolifération cellulaire conduisant à la morphogenèse ou au remodelage tissulaire. Le phénotype contractile procure leur motricité aux vaisseaux sanguins, avec une capacité réduite de synthèse des protéines de la MEC et une capacité proliférative faible (Bkaily et al. 2021). Le phénotype majoritaire des CMLVs (90%) de l'individu mature en conditions physiologiques est le phénotype contractile qui fonctionne comme régulateur du diamètre des vaisseaux et du flux sanguin, toutefois les CMLVs peuvent subir un remodelage dans diverse conditions comme une lésion vasculaire ou des pathologies tels que l'athérosclérose ou l'hypertension. Le phénotype non contractile, ne régule pas la contraction vasculaire et n'exprime aucun gène marqueur de VSMC contractile. Comme les fibroblastes, ces CMLVs se caractérisent par leur capacité à contrôler la reconstruction vasculaire et présentent une activité synthétique élevée. En cas de lésion vasculaire, ces cellules sont les premières à être attirées sur le site de la lésion en migrant et en proliférant et sont responsables de la reconstruction vasculaire par la synthèse de protéines et de molécules spécifiques. Ce remodelage des CMLVs est particulièrement délétère dans l'athérosclérose puisqu'il participe à la rigidification artérielle (voir chapitre 3.2.2). Concernant l'hypertension, le remodelage des CMLVs affecte la contractilité des cellules responsables du tonus vasculaire principalement lié à une augmentation des facteurs vasoconstricteurs libérés notamment par les cellules endothéliales (angiotensine II, endothéline-1) (Bkaily et al. 2021; Leenen 2014).

### **1.2.1.3 Fibroblastes**

Les fibroblastes sont les cellules principales du tissu conjonctif dont le rôle est de protéger les tissus et organes qu'il entoure et, au niveau vasculaire, les fibroblastes sont les constituants majeurs de l'adventice. Ils assurent la production, l'organisation et la dégradation des éléments de la MEC. En effet, les fibroblastes synthétisent les glycoprotéines et les protéines de la MEC de l'adventice, en particulier les procollagènes précurseurs du collagène. Ils sont également capables de synthétiser et sécréter de la tropoélastine. Ils organisent et remodelent activement la MEC par la production de protéinases (MMP/TIMP) (Figure 16) (Kuwabara et Tallquist 2017; Stenmark et al. 2013; Sauvage et al. 1998; Sorrell et Caplan 2009).

Si les fibroblastes jouent un rôle majeur de sécrétion et de régulation de la MEC (notamment via la production de protéases), ils sont également capables de se différencier en myofibroblastes, qui sont des cellules spécialisées dotées de propriétés contractiles et migratoires dans le cadre de la réparation cellulaire liées à une blessure en déposant une cicatrice de collagène, comme dans la peau après un traumatisme ou le cœur après un infarctus. En outre, les myofibroblastes sont des cellules effectrices clés dans la quasi-totalité des fibroses organiques en accumulant et en contractant de manière persistante le tissu cicatriciel (Pakshir et al. 2020; Havelka et Kibbe 2011).

Les fibroblastes ont également un rôle central dans la communication cellulaire, que ce soit avec les autres cellules adventitielles comme les cellules neurales, dont certaines terminaisons nerveuses se situent dans l'adventice, ou encore les cellules d'origine hématopoïétique (cellules dendritiques, macrophages, lymphocytes-T). L'adventice vasculaire agit comme un centre de traitement biologique pour la récupération, l'intégration, le stockage et la libération des régulateurs clés de la fonction de la paroi vasculaire ce qui lui permet de détecter et de diriger les réponses

à un large éventail de stimuli tel qu'un stress hormonal, inflammatoire ou environnemental (par exemple : l'hypoxie ou la distension vasculaire). Cette fonction est assurée par la sécrétion de facteurs de croissances, de cytokines et de chimiokines. Les fibroblastes n'ont pas de fonction vasomotrice en tant que telles. Pourtant, l'adventice joue un rôle dans la régulation de la vasomotricité par la libération des neurotransmetteurs via les terminaisons nerveuses présentes dans cette tunique de la paroi vasculaire (Stenmark et al. 2013; Sorrell et Caplan 2009).

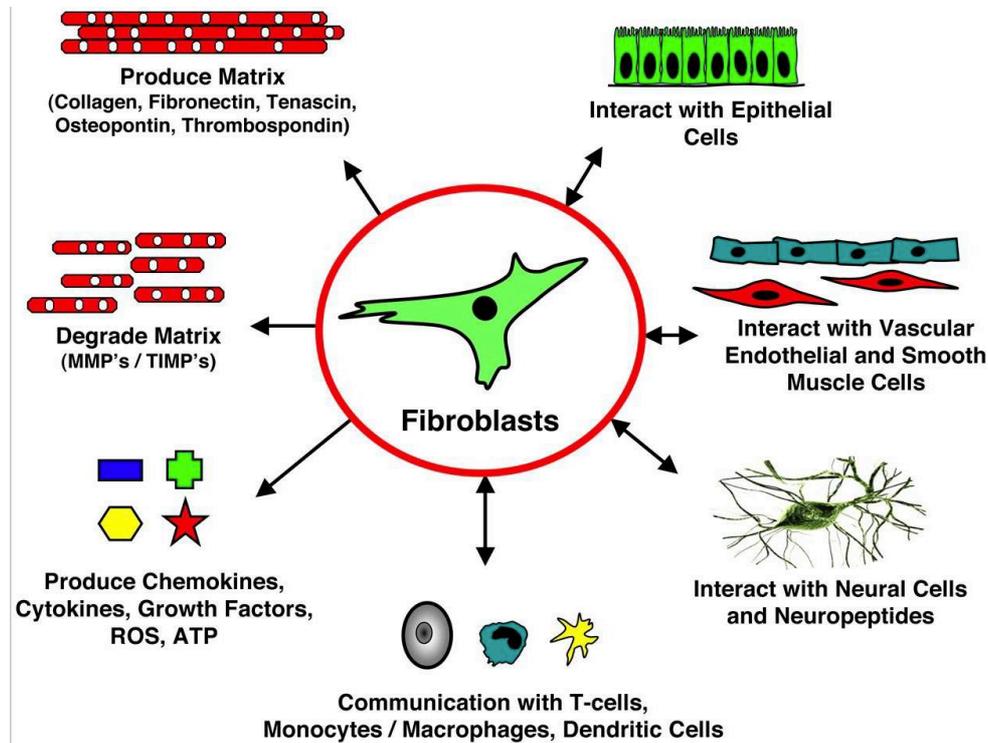


Figure 16 -Rôle des fibroblastes dans le contrôle de la fonction vasculaire. (Stenmark et al. 2013)

## 1.2.2 La matrice extracellulaire vasculaire

Outre les cellules, le second acteur majeur de la structure/fonction des artères est la matrice extracellulaire (MEC). C'est un ensemble de molécules et macromolécules (fibres élastiques dont l'élastine, collagènes, protéoglycanes et glycoprotéines) qui assure le lien et la cohésion entre les différentes cellules d'un tissu, qui peut avoir une fonction de signalisation cellulaire et qui peut assurer un rôle mécanique propre pour fournir la solidité des tissus/organes, les rendre plus rigides, ou plus élastiques. La MEC entoure les cellules qui la synthétisent et agit en retour sur leur phénotype. La description et l'analyse de la MEC fera l'objet du chapitre suivant (Karamanos et al. 2021).

## 2 Matrice extra cellulaire vasculaire

La matrice extracellulaire est un réseau dynamique tridimensionnel de molécules et macromolécules extracellulaires qui fournit un support structurel aux cellules et aux tissus. Elle est présente dans tous les tissus et organes. Ses principaux constituants sont des protéines tels que l'élastine et les collagènes, des glycoprotéines ou encore des protéoglycanes. (Karamanos et al. 2021) La MEC, au niveau vasculaire, est sécrétée par les trois types de cellules vasculaires (cellules endothéliales, CMLVs et fibroblastes) au cours du développement et de la croissance. A l'âge adulte, la synthèse et le renouvellement des composants de la MEC sont inégaux : par exemple, la production d'élastine fonctionnelle est quasi inexistante après l'adolescence alors que d'autres molécules continuent d'être produites normalement (Wagenseil et Mecham 2009; Karamanos et al. 2019). La MEC confère aux vaisseaux sanguins une part importante de leurs propriétés mécaniques, notamment élastique médié par les fibres élastiques (microfibrilles et élastine) et leur rigidité apportée par les collagènes (principalement collagène I et III dans les artères). Quantitativement, la MEC peut représenter plus de 50% du poids sec d'un vaisseau (c'est le cas de l'aorte ascendante) (Wagenseil et Mecham 2009; Clark et al. 2015).

Outre son rôle de support et structure, la MEC régule également de nombreux processus cellulaires, notamment la croissance, la migration, la différenciation, la survie, l'homéostasie et la morphogénèse (Karamanos et al. 2021). Nous allons ici nous intéresser particulièrement aux éléments constitutifs de la paroi artérielle.

### 2.1 Les collagènes

Alors qu'il n'existe qu'une seule protéine d'élastine, il existe plusieurs types de collagène. Ils forment une famille de protéines de la matrice extracellulaire, qui partagent un même motif structurel, la triple hélice. Vingt-huit types de collagène numérotés par des chiffres romains (I-XXVIII) ont été identifiés (Karamanos et al. 2021; Ricard-Blum et Ruggiero 2005). Les collagènes agissent comme une ossature fournissant à la MEC et aux tissus leur organisation structurelle et leurs propriétés mécaniques. La plupart des types de collagène forment des assemblages supramoléculaires, qui définissent les sous-familles de collagène, en association avec d'autres composants de la MEC. Les collagènes forment des fibrilles (Bella et Hulmes 2017), des fibrilles d'ancrage (collagène VII), des filaments perlés (collagène VI), des réseaux (collagènes IV, VIII et X). En revanche, certains collagènes ne sont pas capables de former des assemblages supramoléculaires par eux-mêmes mais s'associent à des assemblages existants tels que les FACIT, qui sont situés à la surface des fibrilles de collagène I et II (Karamanos et al. 2021).

Dans la paroi artérielle, les fibres de collagène, beaucoup plus rigides que les fibres élastiques, sont impliquées dans la limitation de l'étirement (voir chapitre 2.4). Les collagènes les plus abondants sont les types I et III, appartenant à la sous famille des fibrilles, et le type IV, qui forme des structures en réseau ainsi que des quantités moindres de types V et VI. Les quantités et l'organisation transmurale des types de collagène dépendent de la localisation dans l'arbre cardiovasculaire (Howard et Macarak 1989). Les collagènes fibrillaires de types I et III sont les principaux composants de l'intima, de la media et de l'adventice, tandis que les collagènes de types I, III, IV et V sont présents dans la membrane basale. Le degré de réticulation

du collagène est un déterminant clé des propriétés mécaniques des tissus collagéniques, et son altération modifie considérablement le comportement artériel en cas de pathologie et de vieillissement (Greenwald 2007).

Outre leur rôle dans le genèse des tissus, les collagènes interagissent avec les récepteurs de la surface cellulaire et régulent de nombreux processus biologiques, soit en tant que protéines complètes, soit via leurs fragments bioactifs, appelés matricryptines ou matrikines (Karamanos et al. 2021). Les activités biologiques des matricryptines sont médiées par le réseau d'interaction qu'elles forment avec les intégrines et les récepteurs des facteurs de croissances (Growth factors) (Ricard-Blum et Vallet 2016). Ils régulent de nombreux processus biologiques tels que l'autophagie, l'angiogenèse, l'adipogenèse, la fibrose, la croissance tumorale, les métastases et la cicatrisation. Des changements dans l'expression, le dépôt, la réticulation et/ou la dégradation du collagène se produisent dans de nombreuses pathologies où l'organisation du collagène stromal est altérée, notamment le cancer (Bourgot et al. 2020) et la fibrose (Ricard-Blum, Baffet, et Théret 2018; González et al. 2019). Des études ont montrées qu'au niveau cardiaque, le contenu total en collagène n'est pas statique et que 5% du contenu en collagène du cœur est renouvelé tous les jours par un processus de dégradation et de synthèse (Weber et al. 1995). Il existe donc un équilibre délicat entre la synthèse et la dégradation du collagène dans le système cardiovasculaire et tout dérèglement, par exemple au cours du vieillissement ou de pathologies, perturbe cet équilibre et entraîne une accumulation de collagène qui provoque une fibrose. Les tissus de la fibrose myocardique sont principalement composés de collagène de type I (fibres hautement réticulées de grand diamètre) et de collagène de type III (fibres non réticulées de petit diamètre) (Weber 1989). En raison de la différence des propriétés biophysiques de ces fibres, un petit changement dans le rapport entre le collagène de type I et le collagène de type III peut modifier la rigidité du réseau cardiovasculaire et entraîner une altération de sa structure/fonction (Janicki et Brower 2002; Zile et al. 2015). Ainsi, la gravité de la fibrose et plus particulièrement le type de fibres de collagène impliqué peut être un indicateur intéressant de suivi de l'altération du système cardiovasculaire (Sahu et al. 2020). Une étude de McNulty et ses collaborateurs a par ailleurs indiqué que le rapport synthèse/dégradation du collagène de type I est en corrélation négative avec la rigidité artérielle. Ce qui suggère que la synthèse du collagène de type I est corrélée à une diminution de la rigidité artérielle (McNulty et al. 2006).

## 2.2 Les glycoprotéines

Les glycoprotéines sont des protéines portant un ou plusieurs groupements glucidiques. Outre les fibrillines, les principales glycoprotéines du réseau vasculaire sont les fibronectines, les laminines, les ténascines et les thrombospondines. Elles sont capables de s'auto- associer et de s'associer aux autres protéines de la MEC, et d'interagir avec les cellules par l'intermédiaire des intégrines. Ces protéines sont impliquées dans la régulation du remodelage tissulaire, de la morphogenèse et de la croissance des vaisseaux (Yamada 1983; Karamanos et al. 2021; Theocharis et al. 2016; Sayantan Jana et al. 2019).

Les laminines, sont une famille qui contient au moins 16 membres et chaque molécule est constituée de trois chaînes :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Les laminines 211 et 221 sont présentes

dans la membrane basale des muscles squelettiques et cardiaques, alors que les laminines 411 et 421 se trouvent dans la membrane basale des cellules endothéliales et la laminine-332 dans la membrane basale de l'épithélium (Aumailley 2013; Holmberg et Durbeej 2013). Les laminines sont les composants non collagéniques majoritaires et ubiquitaires des lames basales où elles sont assemblées en polymères et interagissent avec différentes protéines de la MEC comme le collagène IV et l'héparane sulfate. Elles sont également capables d'interagir avec les cellules via les intégrines (Belkin et Stepp 2000). Des études ont également montrés que la laminine possède la capacité d'activer le récepteur de l'élastine (EBP) qui, à une époque, a été appelé « récepteur de l'élastine/laminine (G. Faury 1998). Elles jouent un rôle majeur dans le remodelage vasculaire et la régulation de fonction des CE (Grant et al. 1989; G. Faury 1998)

Les fibronectines sont des macromolécules capables de former des assemblages supramoléculaires qui régulent les propriétés mécaniques telles que la tension due aux changements de conformation de ses fibres. La fibronectine interagit également avec les intégrines qui régulent l'adhésion cellulaire, ainsi qu'avec les facteurs de croissances (GF), les cytokines et les molécules de la MEC (Fonta et al. 2020; Zollinger et Smith 2017). Des études montrent que la fibronectine est surexprimée dans l'anévrisme aortique (Della Corte et al. 2008; Lindsay et Dietz 2011). De plus, des études montrent que la fibronectine est surexprimée dans la paroi artérielle dans un contexte d'hypertension artérielle (L. Robert et Labat-Robert 2014).

Les ténascines (TN), appartiennent au groupe des protéines matricellulaires et comprennent quatre membres : TN-C, TN-R, TN-W et TN-X. Les TN comprennent trois domaines différents, des domaines de type EGF, des domaines de type III de la fibronectine et un globe de type fibrinogène. Beaucoup de ces domaines interagissent avec plusieurs autres protéines de la MEC, comme les collagènes, la fibronectine, les fibrillines, les protéoglycanes, les facteurs de croissance, les chimiokines et d'autres facteurs solubles (Karamanos et al. 2021). Des études montrent que la diminution du niveau de ténascines est liée à la dissection de l'anévrisme aortique (Della Corte et al. 2008; Lindsay et Dietz 2011).

Les thrombospondines sont des glycoprotéines matricellulaires considérées comme des protéines non structurales de la MEC, possédant des fonctions comme la régulation cellulaire, principalement par leur interaction avec un grand nombre de récepteurs de surfaces, de ligands tels que les cytokines, de récepteurs cellulaires, de facteurs de croissance, de protéases et de protéines de la MEC. Elles sont notamment exprimées en réponse à une blessure vasculaire. Il existe 5 thrombospondines notées de 1 à 5 (TSP-1 à -5). Des études récentes montrent que les thrombospondines jouent un rôle dans les anévrismes vasculaires (Plana et al. 2022) et qu'elles sont impliquées dans la régulation du remodelage artériel, les TSP-1 et TSP-2 sont des promoteurs du remodelage artériel, tandis que la TSP-5 serait des glycoprotéines protectrices. (Kassem et al. 2019).

### **2.3 Les protéoglycanes**

Les protéoglycanes (PG) sont exprimés de manière ubiquitaire par tous les types de cellules. Au niveau structurel, les PG sont constitués d'une protéine centrale dans laquelle une à plus de cent chaînes de GAG sont attachées de manière covalente. Des variations dans la structure de l'unité disaccharide et le degré de sulfonylation

définissent six GAG différents : le chondroïtine sulfate (CS), le dermatane sulfate (DS), L'héparine (Hep), l'héparane sulfate (HS), le kératane sulfate (KS) et le hyaluronane (HA) (Mourão 1991; Afratis et al. 2012). Ils possèdent un large éventail de fonctions aussi bien physiologiques (hydratation de la MEC, assemblage supramoléculaire, homéostasie, développement, cicatrisation, réparation tissulaire et sénescence) que pathologique (inflammation, autophagie, fibrose, arthrose, athérosclérose et cancer) (Karamanos et al. 2021)

Au niveau cardiovasculaire :

- les GAGs renforcent le collagène et les fibres élastiques et jouent un rôle important dans la rigidité artérielle et l'homéostasie mécanique artérielle (Sorrentino et al. 2015).
- L'héparane sulfate est nécessaire aux microfibrilles et à la tropoélastine au cours de l'élastogénèse (voir chapitre 2.3.3) (Wassim Fhayli et al. 2019a; Boraldi et al. 2018)
- Dans les premiers stades de la lésion vasculaire, avant que les modifications du collagène ne soient détectées, les GAG sont régulés à la hausse et favorisent les modifications du phénotype des cellules musculaires lisses (Wight 2008). Des GAGs élevés sont détectés dans les aortes de rats spontanément hypertendus avant l'apparition de l'hypertension et compromettent la distensibilité et la mécanosensibilité de l'aorte (Reynertson et al. 1986; Roccabianca, Bellini, et Humphrey 2014).
- Le glycocalyx luminal (revêtement fibrillaire situé à la face externe de la membrane plasmique de certaines cellules comme les fibroblastes ou les CMLVs et composé de glycoprotéines et PG) est la première ligne de défense de la paroi vasculaire, et les modifications de ces protéoglycanes ont un impact sur la mécanique de l'endothélium sous-jacent (Fels et al. 2014). Une étude a montré qu'un régime riche en sel endommage le glycocalyx, permettant au  $\text{Na}^+$  de pénétrer dans la paroi vasculaire (Oberleithner et al. 2011). En conséquence, la production d'oxyde nitrique (NO) est supprimée, ce qui entraîne un dysfonctionnement endothélial et une rigidité vasculaire (Kusche-Vihrog, Schmitz, et Brand 2015; Ogola et al. 2018).

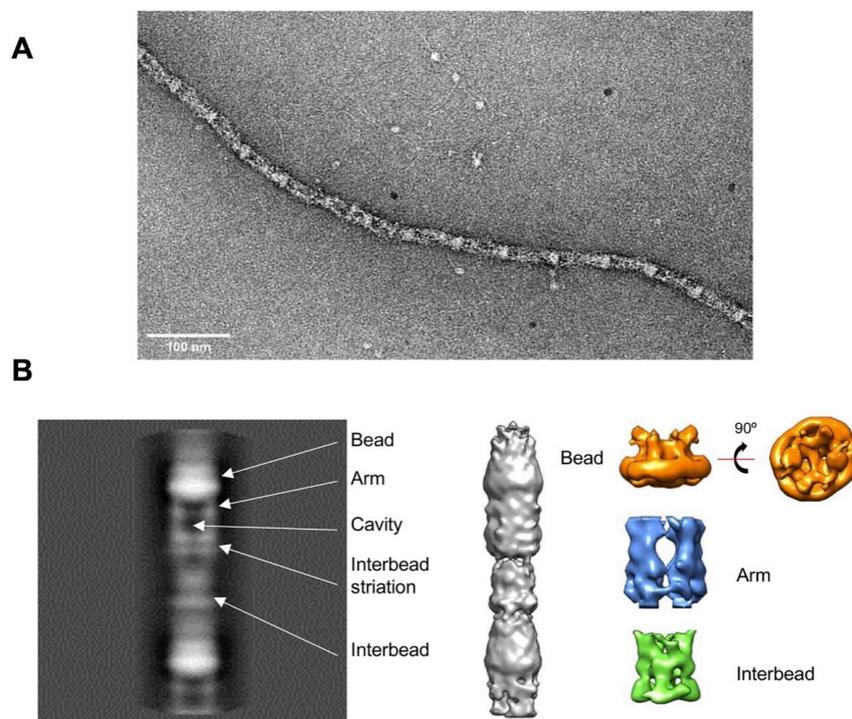
## 2.4 Les fibres élastiques

L'élasticité est une propriété de certains tissus extensibles comme la peau, les poumons ou encore les grosses artères élastiques. Au niveau vasculaire, les fibres élastiques assurent le lissage de la pression et du flux sanguins discontinus et pulsatiles sortant du cœur, et assurent ainsi une perfusion continue des organes et tissus (effet Windkessel). En systole, le volume sanguin important éjecté sous pression par le cœur provoque la distension de l'aorte et des artères élastiques proximales afin d'accommoder ce volume. Cette capacité de distension réversible, appelée élasticité, est rendue possible par la présence, dans les parois artérielles, de fibres élastiques qui s'étirent et emmagasinent de l'énergie pendant cette phase. À la fin de la systole, lorsque le cœur arrête de propulser le sang dans le système circulatoire, les fibres élastiques étirées restituent l'énergie emmagasinée en appliquant une pression sur le sang, ce qui permet à ce dernier de continuer à circuler durant la diastole (G. Faury

2001b; Cocciolone et al. 2018). Ce lissage permet donc de maintenir un flux sanguin et une pression sanguine élevés en diastole dans les artères. Les fibres élastiques responsables de l'élasticité artérielle sont composées à 90% d'élastine, et à 10% de microfibrilles riches en fibrilline-1 mais contenant aussi de nombreux autres composants (Figure 19) (Faury 2001; Fhayli, Boëté et al. 2019). Ce sont des structures très stables, assemblées dans les premiers stades du développement avec un renouvellement très faible ou absent à l'âge adulte. Toute perte d'élasticité artérielle, due à une dégradation mécanique ou enzymatique des fibres élastiques, a des conséquences délétères majeures sur la fonction cardiaque, la pression sanguine, l'hémodynamique et la perfusion des organes (Fhayli, Boëté et al. 2019).

### 2.4.1 Les microfibrilles

Les microfibrilles constituent environ 10% des fibres élastiques. Ce sont des complexes protéiques formant des filaments de 10 à 12 nm de large ayant l'apparence d'un collier de perle avec une périodicité de 56 nm. La microfibrille peut être décrite par trois régions distinctes appelées les régions de « perle » (Bead), de « bras » (arm) et « inter-perle » (interbead). La région « perlée » de la microfibrille a un noyau dense entrelacé entouré d'une structure annulaire qui forme quatre « bras » qui se combinent dans la région « interperle » plus dense. La région « perlée » contient les extrémités N- et C-terminales des molécules de fibrilline. La microfibrille est pseudo-symétrique, soutenant les modèles qui décrivent huit molécules de fibrilline en coupe transversale (Figure 17) (Godwin et al. 2019).



**Figure 17 - (A) Image par microscopie électronique à transmission (MET) à coloration négative d'une microfibrille. Barre d'échelle = 100 nm. (B) Le panneau de gauche montre un alignement de particules d'une répétition de microfibrilles de fibrilline. Taille de la boîte = 102 × 102 nm. Le panneau de droite montre : en gris, une reconstruction 3D d'une microfibrille de fibrilline. Des reconstructions séparées de la perle (bead), du bras (arm) et des régions inter-perles (interbead) de la microfibrille sont montrées. (Godwin et al. 2019)**

Les microfibrilles sont retrouvées soit associées à l'élastine, où elles jouent un rôle de support à l'élastogénèse, soit seules dans les tissus dépourvus d'élastine (zonules ciliaire de l'œil, humeur vitrée) auxquels elle confère élasticité et extensibilité. Ce sont des structures extrêmement conservées et, chez certains invertébrés dépourvus d'élastine, elles y assurent seules l'élasticité vasculaire dans le cadre d'un système circulatoire ouvert à basse pression (G. Faury 2001b; Godwin et al. 2019; Baldwin et al. 2013). Les microfibrilles sont majoritairement formées de fibrillines mais de nombreuses autres molécules peuvent collocaliser ou interagir avec ces dernières comme les glycoprotéines associées aux microfibrilles (MAGP-1 et 2), les elastin microfibril interface located protein (Emilines), les latent TGF $\beta$ -binding proteins (LTBP), "A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin type-1 repeats" (ADAMTS) ou encore la famille des fibulines (Figure 17) (Karamanos et al. 2021; Thomson et al. 2019).

- Chez l'Homme, il existe 3 sortes de fibrillines : la fibrilline 1 (FBN1), la fibrilline 2 (FBN2) et la fibrilline 3 (FBN3) codées par les chromosomes 15q21.1, 5q23-q31 et 19p3 respectivement. Tandis que pour les modèles murins, seul les deux premières fibrillines sont retrouvées, le gène de la FBN3 ayant vraisemblablement été désactivé (Corson et al. 2004). Les trois isoformes de fibrilline sont hautement homologues les unes aux autres, avec des différences, notamment une région riche en proline dans la fibrilline-1, riche en glycine dans la fibrilline-2 et riche en proline et en glycine dans la fibrilline-3 (Pereira et al. 1993). Il existe sept domaines TB (également appelés domaines 8 cystéine) qui sont uniques à la superfamille de la fibrilline. Ils ont une structure globulaire et le domaine TB4 contient un motif RGD impliqué dans la liaison aux intégrines  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$  et  $\alpha v\beta 6$  et essentiel pour l'interaction entre la fibrilline-1 et la surface cellulaire (Figure 18) (Godwin et al. 2019). Des modèles de souris confirment l'importance critique de la fibrilline-1 pour le développement et la fonction vasculaire. Les souris dépourvues de fibrilline-1 meurent périnatalement d'anévrisme aortique rompu, alors que les souris dépourvues de fibrilline-2 ont une formation apparemment normale de l'aorte, bien que les souris dépourvues de ces deux types de fibrillines présentent un phénotype aortique beaucoup plus sévère que les souris dépourvues de fibrilline-1 (Carta et al. 2006). Les deux fibrillines remplissent donc des fonctions qui se chevauchent partiellement au cours du développement de l'aorte et des grandes artères, la fibrilline-1 étant capable de compenser la perte de la fibrilline-2 mais pas l'inverse (Baldwin et al. 2013).
- Les glycoprotéines associées aux microfibrilles (MAGP-1 et 2) sont de petites protéines localisées sur les microfibrilles. Elles interviennent dans l'assemblage des microfibrilles et durant la coacervation de l'élastine en favorisant le dépôt d'élastine sur les microfibrilles. Au cours de l'élastogénèse, la tropoélastine interagit avec MAGP-1 qui interagit lui-même avec la région N-terminale de la fibrilline-1, ce qui favorise l'attachement de la tropoélastine aux microfibrilles. Pour autant les MAGP ne sont pas indispensables à l'élastogénèse puisque des études sur des souris dépourvues du gène MAGP-1 présentent des microfibrilles et un assemblage de fibres élastiques normaux (Brown-Augsburger et al. 1996; Godwin et al. 2019).
- Les elastin microfibril interface located protein (Emilines-1 et -2) sont des glycoprotéines présentes à l'interface entre l'élastine et les microfibrilles. Les Emilines-1 et -2 se trouvent sur les sites où les microfibrilles d'élastine et de

fibrilline sont très proches les unes des autres, elles sont déposées sur la fibrilline-1 et corégulées avec elle (Schiavinato et al. 2016). Elles sont nécessaires à la formation des fibres élastiques. Elles ont un rôle régulateur dans l'adhésion cellulaire, la migration et la cicatrisation, et ont été impliquées dans la morphologie des vaisseaux sanguins, l'invasivité des cellules tumorales et la prolifération dermique. EMILIN-1 peut réguler l'élastogénèse en stabilisant les interactions moléculaires entre les composants des fibres élastiques, interagit avec les intégrines  $\alpha4/\alpha9/\beta1$  et peut connecter les cellules aux fibres élastiques en leur fournissant des propriétés spécifiques d'adhésion cellulaire (Danussi et al. 2011; 2013; Schiavinato et al. 2016). Les souris KO pour l'EMILIN-1 présentent une hypertension accompagnée d'une augmentation des niveaux de TGF- $\beta$ , d'une réduction de la prolifération des cellules vasculaires et d'un rétrécissement des vaisseaux sanguins (Zacchigna et al. 2006).

- La famille des latents TGF $\beta$ -binding proteins (LTBP) sont des glycoprotéines extracellulaires présentant des similitudes structurelles avec les fibrillines. Elles jouent un rôle clé dans l'élastogénèse puisqu'une mutation des LTBP provoque une défaillance multi-organes liée à une dérégulation du signal produit par TGF $\beta$ . Il existe quatre LTBP (LTBP-1 à -4), les LTBP1, -3 et -4 jouant un rôle important dans la transformation et la sécrétion du TGF $\beta$ . LTBP2 n'interagit pas avec le TGF $\beta$ , mais a un rôle dans la stabilisation des faisceaux de microfibrilles de fibrilline dans l'œil (Figure 18) (Godwin et al. 2019).

Au niveau vasculaires, les LTBP-2 et -4 sont impliqués dans la formation des fibres élastiques lors de l'élastogénèse et sont capables de se compenser dans certains tissus (Fujikawa et al. 2017). LTBP2 se localise avec les fibres élastiques et le dépôt de LTBP2 dans la matrice dépend de la présence d'un réseau préformé de fibrilline-1, car le knockdown de la fibrilline-1 perturbe le dépôt de LTBP2 (Vehviläinen, Hyytiäinen, et Keski-Oja 2009). Certaines études suggèrent que LTBP2 régule la formation des fibres élastiques d'une manière indépendante de la fibrilline par l'intermédiaire de la fibuline-5, et qu'il peut entrer en compétition pour l'interaction fibuline-5-tropélastine, déplaçant potentiellement les assemblages d'élastine dans l'élastogénèse (Sideek et al. 2014; Hirai, Horiguchi, et al. 2007). LTBP4, pour sa part, joue un rôle important dans l'assemblage des fibres élastiques. En effet, les mutations de LTBP4 entraînent le syndrome d'Urban-Rifkin-Davis (URDS), également connu sous le nom de cutis laxa de type 1C autosomique récessif (voir chapitre 3.3.1.2) (Urban et al. 2009). Un manque de LTBP4 entraîne une distribution et une formation anormales des fibres élastiques, anomalies qui sont reproduites dans des modèles de souris knock-out. (Sternier-Kock et al. 2002; Bultmann-Mellin et al. 2015)

- Les fibulines sont une famille de glycoprotéines comprenant des fibulines longues (fibuline-1,-2,-6) et courtes (fibuline-3, -4, -7). Elles possèdent des motifs RGD leur permettant de se lier aux intégrines. Les fibulines-1, -2, -3, -4 et -5 lient la tropélastine et les fibulines-2, -3, -4 et -5 sont impliquées dans la formation des fibres élastiques, en particulier, la fibuline-4 et la fibuline-5 (également connues sous le nom de Developing Arteries and Neural Crest EGF-like (DANCE)) (El-Hallous et al. 2007; Yanagisawa et Wagenseil 2019). Des études fonctionnelles ont montré que la fibuline-4 se lie à la lysyl oxydase (*Lox*) avec une grande affinité, ce qui entraîne une interaction plus forte avec la tropélastine, suggérant un rôle de la fibuline-4 dans le recrutement de *Lox* et

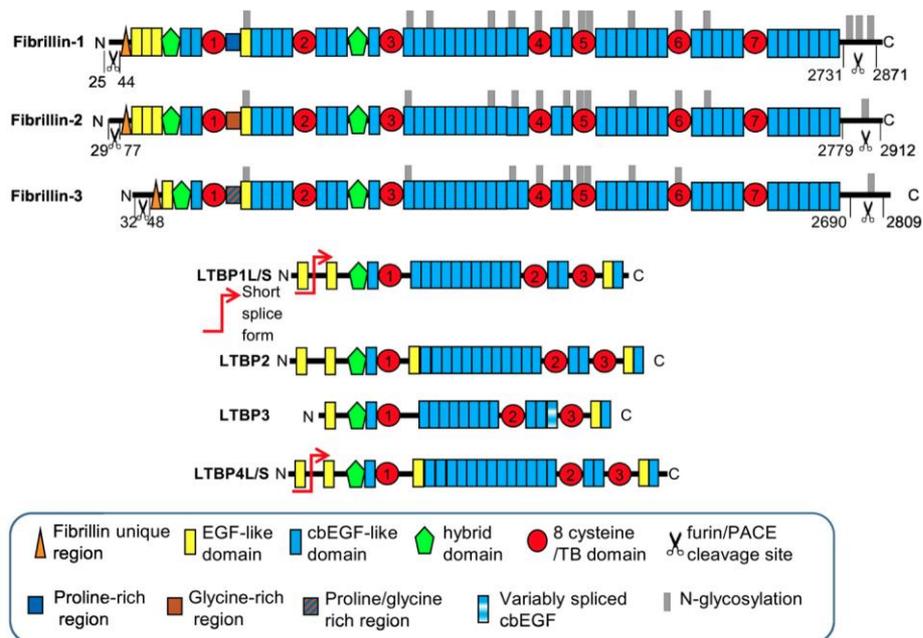
la coacervation de la tropoélastine (Choudhury et al. 2009; Horiguchi et al. 2009). La fibuline-5 présente une forte interaction avec la tropoélastine et interagit avec la famille des lysyl oxydases (*Lox*, *Lox1*, *Lox2* et *Lox4*) pour induire l'assemblage et la réticulation des fibres élastiques (X. Liu et al. 2004; Choudhury et al. 2009; Hirai, Ohbayashi, et al. 2007). De plus, la fibuline-4 et la fibuline-5 se lient toutes deux à la région N-terminale de la fibrilline-1, ce qui suggère un rôle dans le chaperonnage des agrégats de tropoélastine vers les microfibrilles de fibrilline et facilite la formation de fibres élastiques réticulées (El-Hallous et al. 2007; Choudhury et al. 2009).

A l'instar des LTBP, les fibulines présentent des similitudes structurelles avec les fibrillines et leur mutation provoque une défaillance multi organes liée à un remodelage aberrant des tissus en raison de l'altération des interactions avec la lysyl oxydase (*Lox*). Leur déplétion provoque des altérations diverses :

- Une déplétion de la fibuline-5 perturbe l'assemblage des fibres élastiques et conduit à des artères tortueuses (Yanagisawa et al. 2002).
  - Tandis qu'une suppression du gène de la fibuline 4 est létal et la diminution de son expression provoque des effets dépendant du type de vaisseaux concernés. Une telle mutation provoque une altération des fibres élastiques et la formation d'anévrismes au niveau de l'aorte ascendante alors que les artères musculaires et les vaisseaux de résistance, comme les artères mésentérique ou rénal ne sont pas affectées (Halabi et al. 2017).
  - Les souris dépourvues de fibuline-4 et de fibuline-5 n'ont pas de fibres élastiques bien développées, ce qui démontre l'importance de ces deux glycoprotéines dans la formation des fibres élastiques (Nakamura et al. 2002; Yanagisawa et al. 2002; McLaughlin et al. 2006).
- Les ADAMTS ("A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin type-1 repeats") sont une famille de glycoprotéines matricielles qui comprend 19 métalloprotéases de zinc et sept protéines non catalytiques de type ADAMTS-Like (ADAMTSL) ayant de nombreuses fonctions biologiques, notamment la morphogénèse, le développement, l'angiogenèse, l'inflammation et la coagulation, ainsi que le maintien de l'intégrité structurelle des tissus. De façon plus spécifique concernant le rôle des ADAMTS dans l'assemblage des fibres élastiques (Godwin et al. 2019):
- L'ADAMTS10 se colocalise avec les microfibrilles et améliore leur dépôt in vitro (Kutz et al. 2011). Elle est nécessaire à la formation d'adhérences focales par le biais d'interactions avec l'héparane sulfate (HS) et la fibronectine (Cain et al. 2016). Les mutations de l'ADAMTS10 sont à l'origine du syndrome de Weill-Marchesani 1 (initialement provoqué par une altération de la fibrilline, voir chapitre 3.3.1), dont les principales caractéristiques cliniques sont une petite taille, une brachydactylie et une ectopie lentisque (dislocation du cristallin) (Dagoneau et al. 2004; Hubmacher et Apte 2015)
  - À l'inverse, ADAMTS6 appauvrit l'HS en réduisant le nombre de complexes d'adhésion focale, nécessaires au dépôt des microfibrilles de fibrilline-1 (Cain et al. 2016). Par conséquent, les effets modulateurs des ADAMTS6 et -10 sur les adhésions focales jouent un rôle essentiel dans le dépôt des microfibrilles et l'assemblage ultérieur des fibres élastiques. Les modèles de souris avec une perturbation de l'ADAMTS10 montrent

une accumulation de microfibrilles de fibrilline-2 dans divers tissus, ce qui suggère que la fibrilline-2 pourrait être un substrat de l'ADAMTS10 (Mularczyk et al. 2018; L. W. Wang et al. 2019).

- Les protéines ADAMTS-Like n'ont pas d'activité catalytique mais leurs interactions et leur localisation avec les microfibrilles de fibrilline soutiennent un rôle régulateur dans la formation et le dépôt des microfibrilles. ADAMTSL2 se lie à la fibrilline-1 et le site de liaison N-terminal renferme une mutation de la fibrilline-1 qui entraîne le syndrome de Weill Marchesani (WMS) (voir chapitre 3.3.1) (Hubmacher et Apte 2015; Sengle et al. 2012). ADAMTSL2 se lie également à la fibrilline-2 et la délétion d'ADAMTSL2 entraîne une accumulation de microfibrilles de fibrilline-2 (Hubmacher et al. 2015).
- ADAMTSL4 forme un réseau fibrillaire indépendant qui se colocalise avec les microfibrilles de fibrilline-1 et améliore la biogenèse des microfibrilles (Gabriel et al. 2012; Chandra et al. 2013).

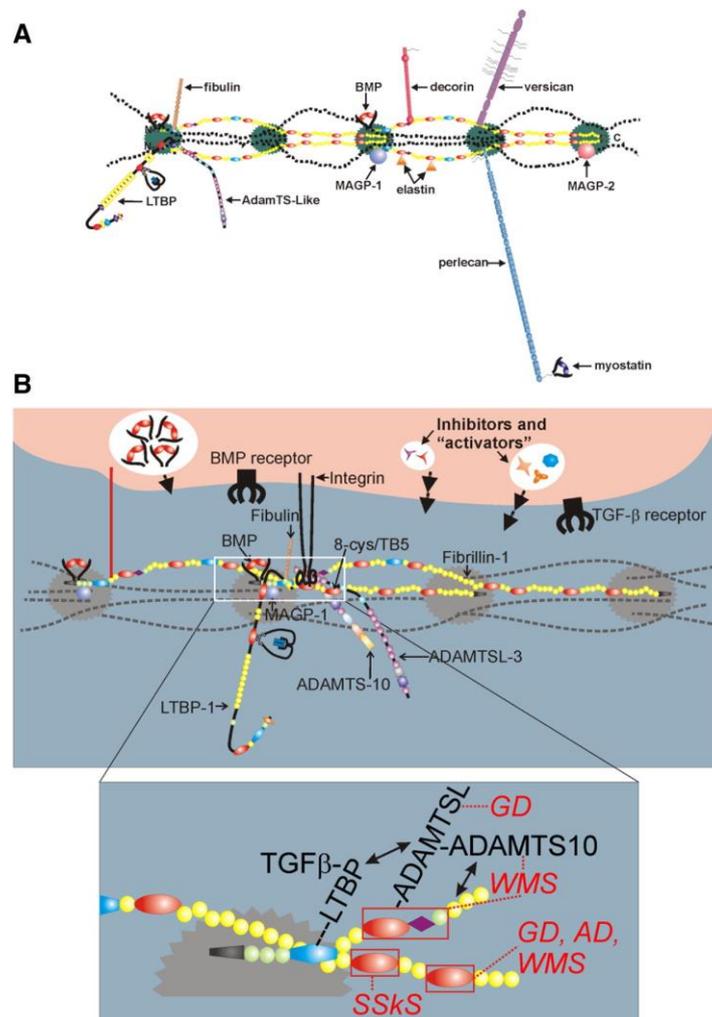


**Figure 18 - Représentation schématique des structures de domaine des membres de la superfamille de la fibrilline, y compris les fibrillines 1-3 et les LTBP1-4. (Godwin et al. 2019)**

Les microfibrilles jouent également un rôle clé dans l'homéostasie tissulaire par leur interaction avec des facteurs de croissance comme le transforming growth factor- $\beta$  (TGF $\beta$ ) ou les protéines morphogénétiques osseuses (BMP) et par leur interaction avec des récepteurs de surface cellulaire tels que les intégrines et les syndécans comme l'héparane sulfate (voir chapitre 2.3) ((Thomson et al. 2019)

Lorsque les microfibrilles sont associées à l'élastine, elles forment une structure qui facilite l'alignement et la réticulation des molécules d'élastine (voir chapitre 2.3.3) (Wagenseil et Mecham 2007). La perturbation de l'échafaudage des microfibrilles riches en fibrilline, due à des mutations du gène de la fibrilline-1, provoque un défaut de régulation du TGF $\beta$  et une augmentation du taux tissulaire de ce dernier ce qui est à l'origine du syndrome de Marfan, un trouble du tissu conjonctif présentant des caractéristiques phénotypiques majeures dans les systèmes cardiovasculaire,

musculo-squelettique et oculaire (Benke et al. 2013). Les mutations du gène de la fibrilline-2 se retrouvent dans l'arachnodactylie contractuelle congénitale avec des manifestations principalement musculo-squelettiques, mais partagent également certaines caractéristiques du syndrome de Marfan (arachnodactylie, scoliose). Les différentes pathologies associées à un défaut des fibres élastiques seront abordées au chapitre 3.3 (Sengle et Sakai 2015).

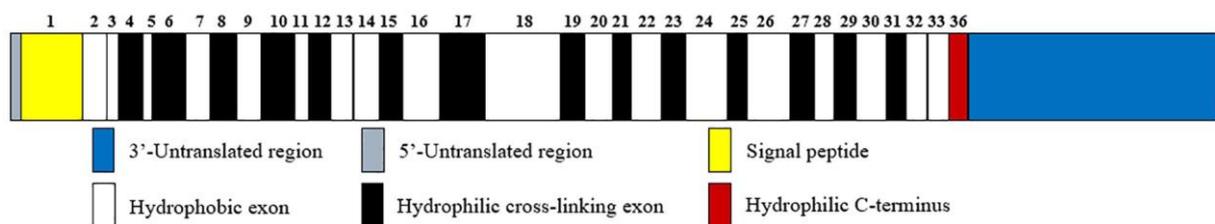


**Figure 19 – Formation et complexité des microfibrilles** A) Les fibrillines se lient aux LTBP, qui sont associées de manière covalente au petit complexe TGFβ latent, aux BMP, aux MAGP-1 et -2, à l'élastine, aux fibulines, aux protéines ADAMTSLike, à la décorine, au versican et au perlecan. Les molécules de fibrilline sont représentées avec des modules de domaines codés par couleur (jaune : domaines EGF-like de liaison au calcium ; rouge : domaines contenant de la 8-cystéine ; bleu : domaines hybrides ; vert : domaines EGF génériques ; violet : domaine riche en proline ; noir : domaines N- et C- terminaux). Des domaines similaires codés par couleur sont présents dans le LTBP. Les lignes noires discontinues indiquent les monomères de fibrilline qui n'ont pas été codés par couleur. B) L'échafaudage de microfibrilles de fibrilline cible et séquestre le grand complexe TGFβ latent (qui consiste en une liaison covalente de la LTBP au petit complexe TGFβ latent) ainsi que les complexes prodomaine BMP/facteur de croissance. La cellule, avec ses récepteurs pour les BMP et le TGFβ, est représentée près de l'échafaudage de microfibrilles de fibrilline. Les inhibiteurs et les activateurs sont également sécrétés par la cellule dans le microenvironnement de la niche. Les intégrines se lient au 4e domaine 8-cystéine (ou TB) contenant un motif RGD. (Sengle et Sakai 2015)

## 2.4.2 L'élastine

L'élastine est le composant majeure des fibres élastiques. Elle représente 90% de ces dernières. C'est un polymère réticulé formé de son précurseur soluble monomérique : la tropoélastine (TE).

La TE est une protéine de 60-70 kDa. Sa structure primaire est caractérisée par une alternance de domaines hydrophobes et hydrophiles, codés par des exons distincts situés sur le chromosome 7 (locus 7q11.2) chez l'Homme et sur le chromosome 5 (5G1) chez la souris (Cocciolone et al. 2018; de Luis, Valero, et Jurado 2000). Les domaines hydrophiles contiennent des motifs Lysyl-Alanine (KA) ou Lysyl-Proline (KP) (Schmelzer, Hedtke, et Heinz 2020) et sont impliqués dans la réticulation covalente induite par les enzymes *Lox* et/ou *Lox-like (Loxl)*, conduisant à l'élastine mature. Les domaines hydrophobes, en revanche, sont responsables de l'élasticité et sont impliqués dans les interactions cellulaires (Schmelzer et al. 2019). Le transcrit primaire de la TE subit un épissage alternatif important qui aboutit à de nombreuses isoformes sans affecter le cadre de lecture. Ainsi, chez l'Homme, 13 variants de l'élastine ont été décrits sans établir pour l'heure de spécificité d'action ou de localisation d'un isoforme particulier (Figure 20), (Karamanos et al. 2021; Hedtke et al. 2019; Reichheld et al. 2019).



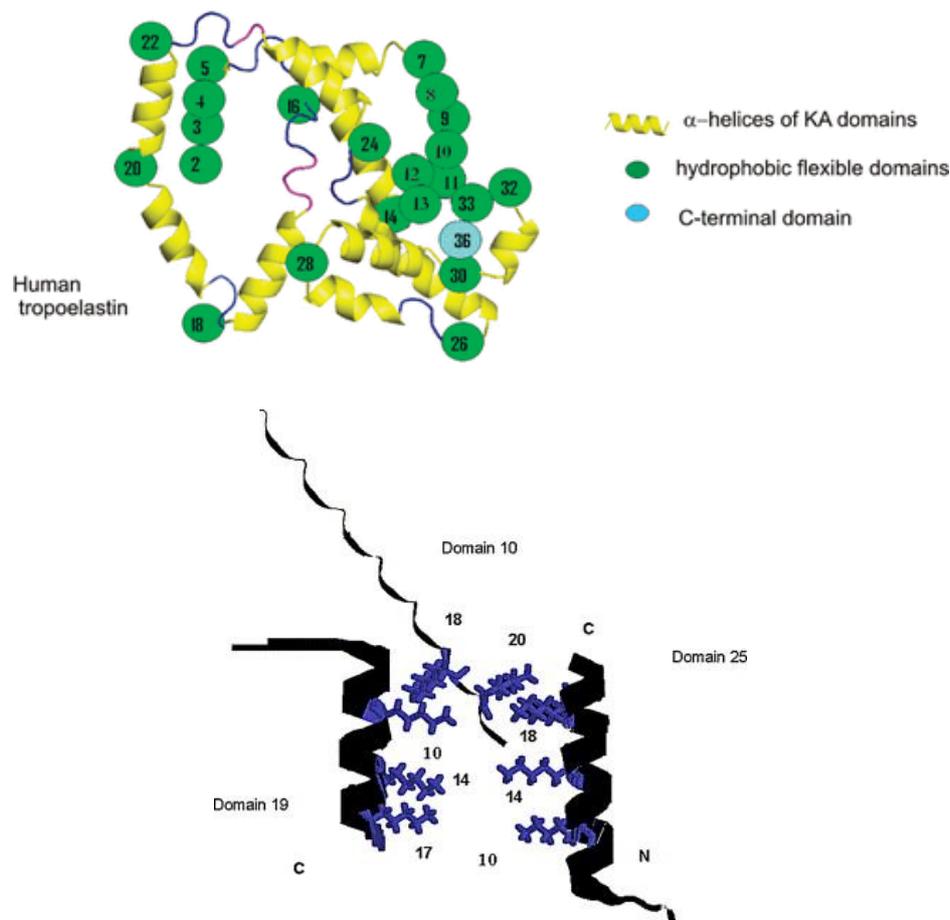
**Figure 20 – Structure de la tropoélastine humaine.** La tropoélastine contient une alternance de domaines de réticulation hydrophobes (rectangle blanc) et hydrophiles (rectangle noir). La largeur des rectangles correspond à la longueur des domaines. Le nombre au-dessus des domaines représente la séquence d'exons qui les codent. Parmi les exons, l'exon 36 code pour une région C-terminale hydrophile (rectangle rouge) ainsi qu'une région 3' non-traduite (rectangle bleu) (K. Wang, Meng, et Guo 2021).

L'élastine est apparue assez tardivement au cours de l'évolution. Bien qu'elle soit présente chez presque tous les vertébrés (excepté certains cyclostomes primitifs, tels que la lamproie et la myxine), elle est absente chez les invertébrés pour qui la circulation sanguine est assurée essentiellement par les microfibrilles (G. Faury 2001b). La structure de la tropoélastine est extrêmement conservée entre les espèces avec cette alternance caractéristique de domaines hydrophobes et hydrophiles même si certaines spécificités d'espèces existent. De façon intéressante, l'exon 36, codant pour la partie C-terminale de la tropoélastine ainsi qu'une large séquence en position 3' non traduite est hautement conservé entre les espèces. Ces éléments suggèrent la potentielle présence d'éléments régulateurs dans cette région du gène (K. Wang, Meng, et Guo 2021; Bernadette Vrhovski et Weiss 1998).

Dans des conditions non-pathologiques, l'élastine mature est métaboliquement stable pendant la durée de vie de l'espèce. Chez l'Homme, sa demi-vie est de 70 ans, et chez la souris l'élastine n'est pas modifiée sur 6 mois, sa demi-vie s'exprime en années (Shapiro et al. 1991; Dubick et al. 1981). L'une des explications de la longévité de l'élastine est lié à sa grande résistance à la protéolyse, principalement due à sa nature fortement réticulée et à la densité des molécules. Sous sa forme mature, l'élastine est

hydrophobe et totalement insoluble, mais son hydratation est nécessaire pour lui permettre d'être dotée de ses propriétés élastiques (B. Li et al. 2001).

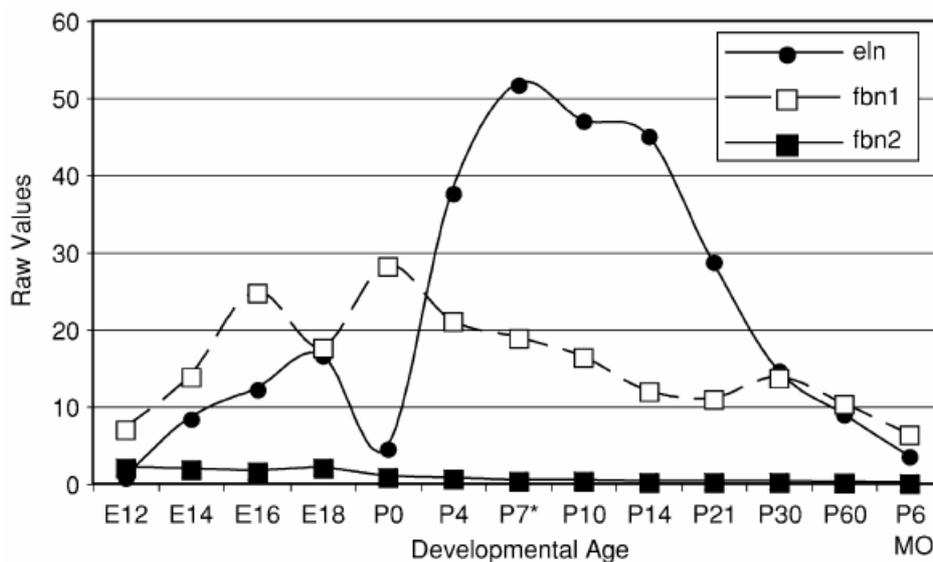
Le produit moléculaire de la TE est une protéine de 750 à 800 acides aminés alternant des domaines hydrophobes, riches en acides aminés tels que la glycine, la proline, la valine et l'alanine apparaissant souvent sous forme de séquences répétées de trois à six peptides tels que GVGVP, GGVP et VGVAPG et des domaines hydrophiles riches en lysine et alanine généralement constitués par deux à trois résidus alanines, tels que AAKAAAKAA (Figure 21) (K. Wang, Meng, et Guo 2021; Boyd et al. 1991; Bernadette Vrhovski et Weiss 1998). L'analyse de la conformation de séquences polypeptidiques codées par les exons individuels de la tropoélastine humaine a démontré la présence de conformations labiles, comme la poly-proline II (PPII) et les coudes  $\beta$ , dont la stabilité dépend fortement du milieu. Les structures périodiques, telles que l' $\alpha$ -hélice, sont présentes seulement dans les séquences poly-alanine des domaines de réticulation. Cela donne une base expérimentale solide à la compréhension du mécanisme moléculaire de l'élasticité de l'élastine. En particulier, cela étaye fortement la description de l'état natif relaxé de la protéine en termes d'équilibre entre conformations étendues et repliées (Figure 21) (Antonio M. Tamburro, Bochicchio, et Pepe 2005; Vindin, Mithieux, et Weiss 2019).



**Figure 21 – Panneau du haut : Structure tridimensionnelle de la tropoélastine et panneau du bas : modèle proposé d'interactions entre les domaines impliqués dans la réticulation de la tropoélastine, les domaines 19 et 25 sont principalement en hélice- $\alpha$ , alors que le domaine 10 a une conformation PPII. Les chaînes lysyl-latérales sont mises en évidence en bleu. D'après (Antonio Mario Tamburro, Pepe, et Bochicchio 2006; Antonio M. Tamburro, Bochicchio, et Pepe 2005)**

### 2.4.3 Synthèse et assemblage des fibres élastiques : l'élastogénèse

L'élastogénèse est un processus assez bref couvrant une période restreinte de la vie. Chez l'Homme, l'expression de la TE débute lors de la deuxième moitié du développement fœtal et se poursuit jusqu'à la fin de l'adolescence. Au cours de cette brève période, la tropoélastine est activement synthétisée et assemblée pour former une grande partie des fibres élastiques, puis la synthèse s'arrête presque intégralement et le potentiel élastique de l'organisme est assuré par les fibres existantes (Fhayli, Boëté et al. 2019). Chez la souris, la synthèse d'ARNm de TE augmente de façon linéaire depuis le 14<sup>ème</sup> jour du développement embryonnaire jusqu'à la fin de la gestation. Un arrêt brutal et transitoire de la synthèse est ensuite observé dans les 48h suivant la naissance, puis la synthèse reprend jusqu'au 14<sup>ème</sup> jour post natal. Enfin, le niveau des ARNm de TE diminue rapidement pour atteindre un taux très faible similaire à celui observé chez l'adulte (Figure 22). Concernant l'expression de la fibrilline 1, le gène de la Fbn1 commence à être exprimé avant celui de la TE ce qui est cohérent avec le rôle des microfibrilles dans l'assemblage des fibres élastiques puisque la TE vient se fixer sur les microfibrilles lorsqu'elle commence à être générée pour former les fibres élastiques (voir chapitre 2.3.3).

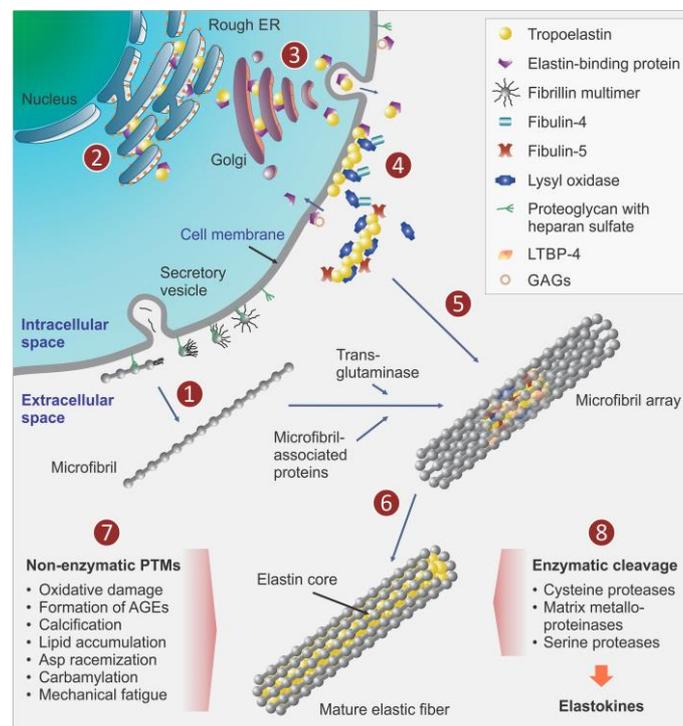


**Figure 22 - Profil comparé de l'expression de l'élastine et des fibrillines 1 et 2 chez la souris, déterminé par puce à ADN (confirmé par PCR en temps réel). Expression des valeurs brutes (Raw values) en fonction de l'âge (Developmental Age). E12-E18 = nombre de jours de développement embryonnaire, PO-P60 : nombre de jours post-naissance et P 6 MO (month-old) : correspond à l'âge de 6 mois. Adapté de (Kelleher, McLean, et Mecham 2004)**

Des études ont montré que la production d'ARNm de TE se poursuit après la fin de l'adolescence mais que les ARNm ne sont pas stables et rapidement dégradés (expliquant les niveaux très faibles d'ARNm de TE détectés chez l'adulte) avant de permettre la formation de protéines matures, ce qui suggère qu'une régulation post-transcriptionnelle bloque l'expression de la protéine TE à l'âge adulte (Swee, Parks, et Pierce 1995).

L'élastogénèse est un processus complexe se déroulant en plusieurs étapes (Figure 23) (Karamanos et al. 2021):

- (1) La fibrilline et les protéines associées aux microfibrilles sont sécrétées dans l'espace extracellulaire, se multimérisent et forment le réseau microfibrillaire.
- (2) La TE est synthétisée sur le réticulum endoplasmique rugueux où il se lie à la protéine chaperonne EBP.
- (3) Le complexe EBP-TE est transporté à travers l'appareil de Golgi et sécrété au niveau de la membrane cellulaire.
- (4) La TE est libérée de la protéine chaperonne et forme des globules à la surface de la cellule, tandis que l'EBP se dissocie suite à l'interaction avec les GAGs. La Fibuline-4 est importante pour l'alignement de la chaîne de la TE en médiant l'interaction avec les Lox. L'oxydation des résidus Lys est suivie de diverses réactions de condensation conduisant à la formation de liaisons transversales covalentes intra- et intermoléculaires.
- (5) Une fois que l'amas de molécules de TE a atteint une taille critique, il est déplacé de la membrane plasmique à travers l'espace extracellulaire. La fibuline-5 dirige l'élastine immature vers les microfibrilles riches en fibrilline.
- (6) Les agrégats d'élastine fusionnent en de plus grands assemblages avec le soutien de la LTBP-4 et sont ensuite réticulés davantage.
- (7) Tout au long de la vie, l'élastine subit diverses altérations causées par des processus non enzymatiques
- et (8) un clivage protéolytique conduit à la libération de peptides bioactifs, appelés élastokines.



**Figure 23 L'assemblage des fibres élastiques. EBP, Elastin Binding Protein ; ER, Endoplasmic Reticulum ; GAGs : glycosaminoglycane, LTBP, Latent TGF $\beta$  Binding Protein ; PTMs, Post-Translational Modifications.** (Karamanos et al. 2021)

De façon plus précise, l'élastogénèse est initiée par l'expression des fibrillines et leur assemblage en microfibrilles, qui servent ensuite d'ossature pour le dépôt de TE (Hubmacher et al. 2008). L'assemblage des microfibrilles se produit au niveau péricellulaire et nécessite la présence de fibronectine, d'intégrines et de protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG). Les molécules de fibrilline sont sécrétées et, après transformation des extrémités N et C par la furine, interagissent de manière homotypique aux extrémités N et C, entraînant un assemblage axial et latéral pour former des microfibrilles. Les « perles » peuvent provenir du repliement des régions terminales. Le réseau de fibrilline est ensuite réticulé par des liaisons disulfures et des liaisons  $\epsilon(\gamma\text{-glutamyl})\text{lysine}$  catalysées par des membres de la famille des transglutaminases, ce qui stabilise la structure tridimensionnelle du faisceau (Reinhardt et al. 2000; Qian et Glanville 1997). La raison pour laquelle la fibronectine est nécessaire au dépôt des microfibrilles n'est pas claire, mais elle peut agir comme un modèle pour l'assemblage et/ou elle peut stimuler la tension du cytosquelette par l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , facilitant ainsi l'assemblage au niveau des adhésions fibrillaires. La fibrilline-1 interagit également avec les intégrines  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha \nu\beta 3$  et  $\alpha \nu\beta 6$  ; cependant, on ne sait pas si ces interactions sont essentielles à l'assemblage des microfibrilles. L'héparine inhibe l'assemblage des microfibrilles, et les HSPG peuvent y contribuer en facilitant les interactions entre la fibrilline-1 de surface cellulaire (Figure 24a) (Baldwin et al. 2013).

Les monomères de TE sont sécrétés par des cellules élastogènes (dans les vaisseaux sanguins principalement les CMLVs mais également les fibroblastes et les cellules endothéliales). La synthèse de la tropoélastine suit les mécanismes intracellulaires classiques de la production de protéines : traduction des ARN messagers (ARNm) à la surface du réticulum endoplasmique rugueux (RER), relargage de la protéine dans la lumière du RER, clivage du peptide signal et sécrétion vers la membrane plasmique via des vésicules sécrétoires (Karamanos et al. 2021). La sécrétion de la TE est toutefois singulière puisqu'elle implique une sécrétion à travers un compartiment acide avant le transport vers la surface cellulaire (Davis et Mecham 1998; Davis et al. 1998). Bien que l'identité du compartiment acide soit inconnue, ses propriétés indiquent qu'il s'agit d'un organite lié aux endosomes et aux lysosomes. Ces structures intracellulaires uniques forment un groupe de compartiments fonctionnellement diversifiés qui partagent des caractéristiques avec les lysosomes (Marks, Heijnen, et Raposo 2013; Delevoye, Marks, et Raposo 2019). Ils sont cependant distincts et contiennent des cargaisons spécifiques qui proviennent généralement du système endosomal (Kozel et Mecham 2019; Raposo et Stoorvogel 2013; Bultema et Di Pietro 2013).

Dans le RER, la TE est associée à une protéine chaperonne de 67 kDa: l'Elastin Binding Protein (EBP) qui va permettre d'éviter une dégradation prématurée de la TE mais également l'empêcher de former des agrégats. En effet, les monomères de tropoélastine sont capables de s'auto-assembler en structure fibrillaire, par l'intermédiaire des domaines hydrophobes, ce processus est appelé coacervation. Ce processus de coacervation est un assemblage non-enzymatique des monomères de TE et est essentiel à l'élastogénèse puisqu'il permet la concentration et l'alignement des monomères de TE, optimisant ainsi la polymérisation ultérieure en favorisant notamment la proximité des résidus lysine localisés dans les domaines de réticulation et donc l'action de l'enzyme de pontage lysyl-oxidase qui est à l'origine des ponts intra et intermoléculaires (Baldwin et al. 2013; Karamanos et al. 2021). Le complexe

EBP/TE est ensuite transporté vers la surface cellulaire par des vésicules de transport depuis l'appareil de Golgi (Kozel et Mecham 2019).

Lorsque la TE atteint le compartiment extracellulaire, l'affinité de l'EBP pour la TE diminue du fait de la liaison entre les galactosides des microfibrilles qui se fixent sur le second site de liaison de l'EBP (le site de liaison aux galactosides) ce qui a pour effet de diminuer l'affinité du site de liaison de la TE pour la TE libérant ainsi le monomère de TE qui va pouvoir s'assembler avec d'autres monomères, étape cruciale de la formation des fibres élastiques (voir chapitre 2.3.3) (Miao et al. 2013; Aleksander Hinek et al. 2006). Les monomères de TE vont ainsi subir le processus de coacervation aux abords de la surface cellulaire. La coacervation est un processus non enzymatique endothermique et entropique (Muiznieks et al. 2018). En effet, des études *in vitro* ont montré que la coacervation est un phénomène dépendant des conditions du milieu, ainsi, les conditions idéales du processus sont une température de 37°C, en deçà la tropoélastine est soluble dans le milieu, une concentration molaire de 150 mM NaCl et un pH compris entre 7 et 8. Dans ces conditions, proches de celui de l'organisme, le coacervat est la forme favorable de la tropoélastine (Jensen, Vrhovski, et Weiss 2000; Fred W. Keeley, Bellingham, et Woodhouse 2002; B. Vrhovski, Jensen, et Weiss 1997). Certaines études suggèrent que pendant la coacervation, la tropoélastine s'auto-associe rapidement de manière à faciliter l'assemblage ordonné en alignant les domaines contenant de la lysine pour la réticulation par la lysyl oxydase (LOX) (Clarke et al. 2006; Muiznieks et al. 2014). La région centrale, y compris les séquences autour des exons 16-17 et de l'exon 30 de la tropoélastine, est particulièrement importante dans le processus de coacervation-assemblage (Hiroshi Wachi et al. 2007; Dyksterhuis et al. 2007; Wise et al. 2005; Kozel et Mecham 2019). Ces exons sont présents dans la protéine synthétique élastique (SEP) qui fait l'objet de cette thèse lui permettant également de coacerver (voir chapitre 2.3.2).

L'EBP quant à elle, pourra soit être recyclée par endocytose pour effectuer de nouveaux transports de monomères de TE néo-synthétisés soit s'associer à deux autres protéines transmembranaires : la protective protein/cathepsin A (PPCA) et la Neurominidase-1 (Neu-1), pour former ce que l'on appelle le complexe récepteur de l'élastine (ERC pour Elastin Receptor Complex), qui est associé à plusieurs voies de signalisation et participe à plusieurs fonctions, qui seront détaillées plus loin (chapitre 2.3.6) (A. Hinek, Keeley, et Callahan 1995; Aleksander Hinek et al. 2006; Wahart et al. 2019).

A ce stade, se forment à la surface de la cellule des globules de TE qui continuent de croître avec le temps. Ces globules peuvent être transférés sur des fibres élastiques préexistantes dans la MEC où ils s'assemblent pour former des structures plus grandes (Kozel et al. 2006). Ce processus peut impliquer des interactions de l'intégrine  $\alpha\beta3$  avec la tropoélastine, et des interactions de l'intégrine avec les protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG) qui peuvent interagir avec la tropoélastine (Baldwin et al. 2013). La coacervation seule n'est pas suffisante pour la polymérisation des fibres élastiques, qui nécessite l'action d'enzymes de réticulation. Les agrégats de tropoélastine sont donc renforcés par des pontages entre les monomères de TE réalisés par des enzymes de la famille des lysyl oxydases (*Lox*). La lysyl oxydase (*Lox*) et les lysyl oxydases like (*Loxl*) sont des enzymes qui catalysent la désamination

oxydative du groupe  $\epsilon$ -amino des résidus Lys en acide  $\alpha$ -aminoadipique- $\delta$ -semialdéhyde hautement réactif, appelé allysine (Schmelzer et al. 2019) en particulier *Lox* et *LoxL1* au niveau artériel (Baldwin et al. 2013; Molnar et al. 2003) conduisant à la formation d'une variété de liaisons transversales, y compris la desmosine et son isomère l'isodesmosine permettant ainsi de former une structure linéaire stable et insoluble : l'élastine polymérisée ou élastine fibreuse (Hedtke et al. 2019; Vallet et Ricard-Blum 2019). Il a été démontré *in vitro* que la réticulation de la tropoélastine par la *Lox* se produit simultanément au dépôt d'élastine sur les microfibrilles (Sato et al. 2017). Ici aussi, l'alignement des TE et les réticulations ultérieures sont favorisés par des éléments connexes que sont la fibuline-4 et la fibuline-5 (Nakamura 2018; Yanagisawa et Wagenseil 2019). En effet, des expérimentations ont été réalisées sur des animaux KO pour la fibuline 4 notamment. Les souris *Fibuline-4<sup>-/-</sup>* meurent dans la période périnatale et présentent des ruptures de l'aorte et/ou des hernies du diaphragme et présentent des fibres élastiques désorganisées et non fonctionnelles, il en est de même pour les poumons (riche en fibres élastiques). Ces animaux KO pour la fibuline 4 ne développent pas de lames élastiques mais présentent plutôt des agrégats d'élastine contenant des filaments contrairement à l'apparence amorphe des fibres élastiques saines (McLaughlin et al. 2006; Hornstra et al. 2003; J et al. 2010). La fibuline-5 potentialise la coacervation de la TE et limite la taille de l'élastine coacervée (Hirai, Ohbayashi, et al. 2007; Cirulis et al. 2008), sa délétion *in vivo* provoque des défauts systémiques des fibres élastiques chez la souris (Nakamura et al. 2002; Yanagisawa et al. 2002). Les deux fibulines ont des rôles distincts dans l'élastogénèse. Des analyses biochimiques ont montré que la région N-terminale de la fibuline-4 se lie à un propeptide de *Lox* et facilite la liaison de la tropoélastine à LOX (Hirai, Ohbayashi, et al. 2007), tandis que la fibuline-5 se lie à *Lox1* par l'intermédiaire du domaine C-terminal et facilite l'attachement de *Lox1* aux fibres élastiques (X. Liu et al. 2004) et/ou l'activation protéolytique du *préproLox1-1* en *Lox1* mature (J. Choi et al. 2009). Ensemble, la fibuline-4 et la fibuline-5 jouent un rôle critique dans l'optimisation des conditions de réticulation de la tropoélastine par la régulation de la coacervation et les interactions avec LOX et LOXL1, respectivement (Yanagisawa et Wagenseil 2019).

L'agrégat de TE ainsi formé reste accroché à la surface cellulaire pour que d'autres monomères puissent s'y agréger. Lorsque l'amas de TE a atteint une taille critique, il est déplacé de la membrane plasmique à travers l'espace extracellulaire sur l'ossature de microfibrilles composée essentiellement de fibrillines stabilisées par la liaison de molécules de calcium au niveau des domaines EGF-like (Epidermal growth factor) et de pontages réalisés par des protéines associées aux microfibrilles (MAGP, fibronectine, intégrines) (Kozel et al. 2006; Czirok et al. 2006). L'élastine apparaît alors de manière discontinue entre les microfibrilles et poursuit son processus de coacervation pour progressivement former le noyau central de la fibre élastique. Les microfibrilles, quant à elles, sont progressivement repoussées à l'extérieur de la fibre pour être de nouveau disponible à l'attachement d'agrégats de TE. Ainsi, les microfibrilles agissent à la manière d'un catalyseur. Ce qui permet d'expliquer pourquoi les microfibrilles sont abondantes à la périphérie des fibres élastiques. L'interaction de la tropoélastine et des fibrillines est réalisée par l'intermédiaire de résidus lysine du domaine amino-terminal des fibrillines, au niveau de sites cryptiques rendu disponibles

lorsque les molécules de tropoélastine se trouvent sur un substrat solide (Trask et al. 2000).

L'assemblage des fibres élastiques implique près de 30 protéines différentes qui sont étroitement coordonnées dans l'espace et dans le temps (Kielty, Sherratt, et Shuttleworth 2002). La fonction de seulement une poignée de ces protéines associées est comprise et l'élucidation de la fonction des autres fait l'objet de nombreuses recherches (Cocciolone et al. 2018). Cette étape implique différentes molécules associées comme les fibulines, en particulier FBN4 et FBN5, capables de moduler la taille et conformation des agrégats d'élastine en développement (Papke et Yanagisawa 2014). Certaines études montrent que les fibrillines-1 et -2 ainsi que les MAGP-2 interagissent avec les intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha5\beta1$  suggérant que ces intégrines seraient impliquées dans l'attachement des microfibrilles à la surface cellulaire avant la sécrétion et le dépôt des molécules de tropoélastine (Bax et al. 2003; El-Hallous et al. 2007). De façon intéressante, alors qu'il a longtemps été admis que la TE ne pouvait pas interagir directement avec les intégrines de la surface cellulaire du fait de son absence de motif RGD, Rodgers et Weiss ont montré dans une étude *in vitro* que la TE peut se lier directement à l'intégrine  $\alpha\beta3$ , par l'intermédiaire d'un site non RGD composé de 16 résidus d'acides aminés codés par l'exon 36 du gène de la TE (partie C-terminale) (Rodgers et Weiss 2004; Nonaka, Sato, et Wachi 2014, 36). Plus récemment, des études ont également montré que la tropoélastine était capable de se lier directement aux intégrines  $\alpha V$  ou encore  $\alpha5\beta1$  (P. Lee et al. 2014; Bochicchio et al. 2021). D'autres intégrines rentrent également en jeu dans ce processus, comme l'intégrine  $\alpha4\beta1$  qui fixe les microfibrilles par l'intermédiaire de la protéine EMILIN-1 (Schiavinato et al. 2016; Spessotto et al. 2003). Ainsi, il a été montré dans une étude chez la souris que l'inactivation de l'EMILIN-1 provoque une altération de l'élastogénèse et de l'ancrage des CMLVs et des cellules endothéliales aux lames élastiques (Zanetti et al. 2004). La fibuline-5, fortement exprimée dans les artères en développement, serait également un médiateur privilégié de l'interaction cellules/fibres élastiques (Nakamura et al. 2002). En effet, l'aorte de souris KO pour le gène de la fibuline-5 contient un réseau de fibres élastiques hautement désorganisé, fragmenté sans élévation concomitante de l'activité élastase, indiquant donc un défaut de développement. La fibuline-5 interagit directement avec les fibres élastiques *in vitro*, elle lie également les intégrines  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$  et  $\alpha9\beta1$  par l'intermédiaire de son domaine amino-terminal. Ainsi, la fibuline-5 permettrait de stabiliser l'attachement des fibres élastiques à la cellule, contribuant de ce fait à l'organisation de la fibre élastique naissante au cours du développement (Nakamura et al. 2002; Yanagisawa et al. 2002). La protéine EMILIN-1 liant l'élastine et la fibuline-5 pourraient également jouer un rôle de stabilisation des interactions moléculaires entre les constituants des fibres élastiques (Zanetti et al. 2004). Enfin, la protéine MAGP-1 liant à la fois la tropoélastine (domaine C-terminal) et les microfibrilles pourrait également être une molécule de liaison importante pour l'assemblage des fibres élastiques (Brown-Augsburger et al. 1994; 1996). L'interaction entre la tropoélastine et les microfibrilles, permettrait ainsi d'aligner les monomères de tropoélastine facilitant leur réticulation ultérieure par la lysyl-oxydase. Néanmoins, il n'est pas certain que les premières étapes de l'assemblage de l'élastine nécessitent des microfibrilles. Comme la tropoélastine subit un degré élevé d'auto-assemblage, les interactions avec les microfibrilles peuvent servir à contrôler l'assemblage des fibres en dirigeant et en médiant la coalescence des agrégats d'élastine à l'extérieur de la cellule. Les microfibrilles pourraient également influencer l'assemblage de l'élastine en interagissant avec des molécules

de signalisation à la surface des cellules et constituer ainsi une cible pour la sécrétion de tropoélastine. Les microfibrilles peuvent jouer de nombreux rôles autres que celui d'échafaudage inerte dans la formation d'une fibre élastique, mais ces rôles doivent être étudiés plus avant (Kozel et Mecham 2019).

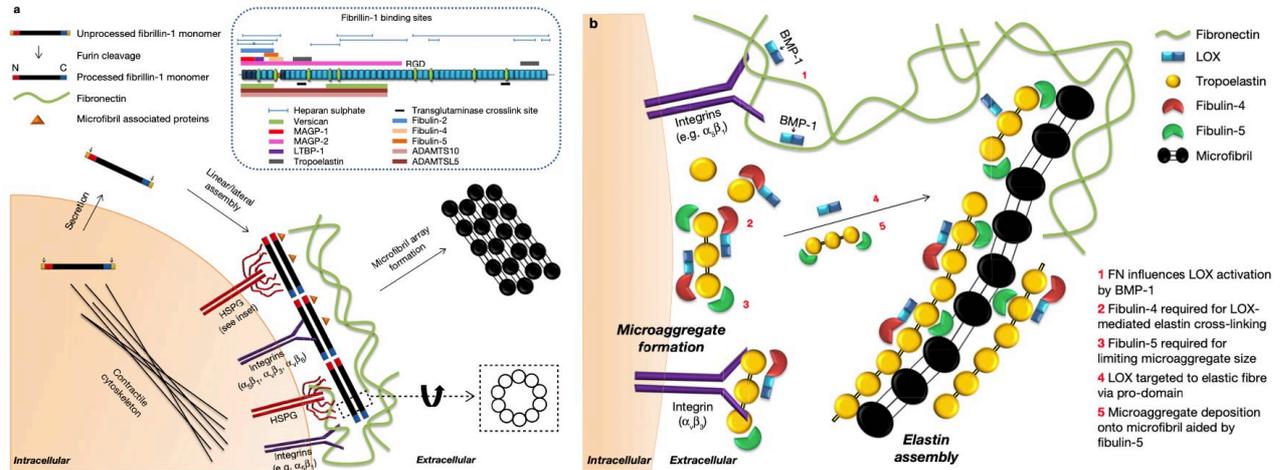


Figure 24 - Schéma de l'assemblage des microfibrilles et des fibres élastiques : assemblage de l'élastine. (a) Assemblage des microfibrilles (b) Assemblage des fibres élastiques (Baldwin et al. 2013)

#### 2.4.4 Maturation des fibres élastiques

Les agrégats de tropoélastine déposés sur le squelette de microfibrilles subissent ensuite un processus de maturation post-traductionnel de pontages entre molécules de TE, médié par la famille des lysyl-oxydases. Deux types de domaines de la TE sont responsables de l'établissement de liaisons croisées (cross-links) entre molécules de TE : les domaines riches en alanine (Lysyl-Alanyl ou KA) et les domaines riches en proline (Lysyl-Prolyl ou KP) (Mithieux et Weiss 2005). Les 5 isoformes des lysyl oxydases (*Lox*) et lysyl oxydase-like (*Loxl1* à *Loxl4*), des amines-oxydases dépendantes du cuivre, catalysent la désamination oxydative des groupes amine primaire des domaines KA et KP en aldéhydes réactifs et agissent en particulier lors de la formation des fibres élastiques (Vallet et Ricard-Blum 2019) Les liaisons sont formées ultérieurement par une condensation spontanée non-enzymatique :

- Soit par l'interaction des allysines entre elles pour former la lysinonorleucine et l'allysine aldol qui, à leur tour, se condensent pour donner la desmosine,
- Soit avec une autre lysine pour donner la mérodesmosine qui, ensuite, se condense avec une autre allysine pour donner l'isodesmosine. Les desmosine et isodesmosine (acides aminés de pontage) rendent l'élastine insoluble, résistante à l'hydrolyse par la plupart des enzymes et surtout fonctionnelle en lui prodiguant ses propriétés élastiques (Umeda, Takeuchi, et Suyama 2001; Umeda, Nakamura, et Suyama 2001).

Afin de mieux définir le rôle de *Lox* dans l'élastogénèse, différentes études ont été menées en invalidant son gène chez la souris. L'inactivation de la protéine *Lox* entraîne la mort des individus *Lox<sup>-/-</sup>* dans les heures qui suivent la naissance. Le décès est provoqué par rupture d'anévrisme et/ou du diaphragme. On retrouve chez ces animaux des fibres élastiques identiques en taille et diamètre mais qui sont désorganisées et fragmentées. De plus, la quantité de desmosines est réduite de 60%

(Mäki et al. 2002; Hornstra et al. 2003). Les souris *Lox<sup>-/-</sup>* présentent également une augmentation de la rigidité aortique en comparaison avec des souris sauvages (Staiculescu et al. 2017). L'inactivation de *Loxl-1* quant à elle n'est pas létale mais entraîne une fragmentation des polymères d'élastine. La protéine *Loxl-1* exerce deux fonctions majeures : elle catalyse la polymérisation de la tropoélastine et est un partenaire clé de la matrice assurant un dépôt spatialement défini de l'élastine par l'intermédiaire de son interaction avec la fibuline-5 (X. Liu et al. 2004; Yanagisawa et Wagenseil 2019).

#### 2.4.5 Régulation de la synthèse d'élastine

Les niveaux d'ARNm de la TE sont diminués à l'âge adulte pourtant, les niveaux de pré-ARNm de la TE sont similaires, ce qui suggère que la régulation post-transcriptionnelle limite l'expression de la tropoélastine à l'âge adulte (Cocciolone et al. 2018; Swee, Parks, et Pierce 1995). La synthèse de l'élastine est régulée de façon continue par une variété de molécules (Figure 25) (K. Wang, Meng, et Guo 2021):

- L'activation des métalloprotéinases matricielles (MMP) (endopeptidases zinc-dépendantes qui dégradent les composants de la MEC) peut favoriser la dégradation de l'élastine et de son précurseur, la tropoélastine. Parmi les MMP, il a été démontré que la MMP-2 (gélatinase A), la MMP-7 (matrilysine), la MMP-9 (gélatinase B) et la MMP-12 (élastase de macrophage) dégradent l'élastine et son précurseur, la tropoélastine. De plus, des études récentes ont rapporté que la MMP-14 (MT1-MMP), a un effet de clivage similaire sur l'élastine, et la MMP-14 est également le médiateur de l'activation de la MMP-2 (Cocciolone et al. 2018; Rabkin 2017; Miekus et al. 2019).
- En revanche, l'augmentation de l'activité des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases matricielles (TIMP) empêchent la dégradation excessive de la MEC causée par les MMP, ce qui peut stabiliser la synthèse de l'élastine (K. Wang, Meng, et Guo 2021).
- En tant que régulateurs en amont des MMPs et TIMPs, les cytokines peuvent provoquer un déséquilibre du rapport MMP/TIMPs (Kwak 2013). Le facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , cytokine pro-inflammatoire), l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ , cytokine pro-inflammatoire) et le facteur de croissance épidermique liant l'héparine (HB-EGF, ligand du récepteur de l'EGF) peuvent stimuler l'activation des MMP et inhiber le TIMP pour induire la dégradation de l'élastine (Hui-Yuen, Duong, et Yeung 2006; Kuang et al. 2002; J. Liu et al. 2003).
- A l'inverse, le facteur de croissance transformant  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1, cytokine profibrotique) peut inhiber l'activation des MMP, particulièrement MMP-2 et MMP-9, et stimuler l'expression du TIMP-1 pour supprimer la dégradation de l'élastine (Alvira et al. 2011; Sproul et Argraves 2013).
- De plus, miR-29b, miR-195 et miR-181b sont des micro-ARN (micro-RNA, miR en anglais) régulateurs épigénétiques de la synthèse de l'élastine. Ces miRNA peuvent inhiber l'expression de l'élastine en ciblant l'UTR 3' de l'ARNm de l'ELN pour restreindre l'activité des MMP et des TIMP afin de participer à la régulation de la synthèse de l'élastine (Zampetaki et al. 2014; Kowara et al. 2017).
- Enfin, d'autres facteurs exogènes peuvent réguler la synthèse de l'élastine, notamment la vitamine C qui inhibe l'expression du gène de l'élastine et la synthèse de la tropoélastine en modifiant la stabilité de l'ARNm (Daamen et Quaglino 2019; Davidson et al. 1997). Ou encore des traitements

pharmacologiques comme le minoxidil ou l'extrait d'aneth (Coquand-Gandit et al. 2017; W. Fhayli et al. 2019; Knutsen et al. 2018; Wassim Fhayli et al. 2020). Les traitements pharmacologiques seront développés dans le chapitre 4.3.

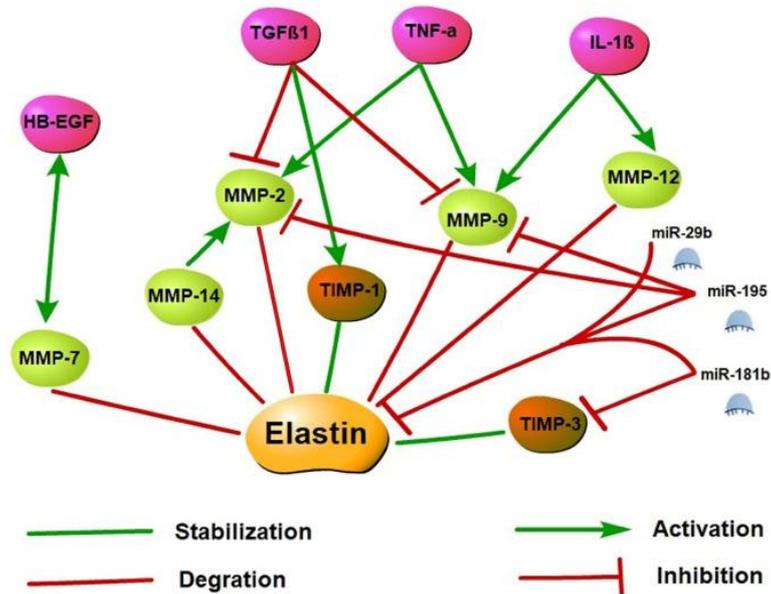


Figure 25 - Synthèse de l'élastine : réseaux de régulation moléculaire. (K. Wang, Meng, et Guo 2021)

## 2.4.6 Rôle biologique de l'élastine et des peptides d'élastine

Bien que longtemps considérée comme une protéine amorphe et fibreuse cantonnée à fournir à l'organisme ses propriétés élastiques (voir chapitre 2.4), de nombreuses études ont montrés que l'élastine et ses dérivés (parfois appelés elastokines) peuvent également signaler et réguler l'activité de divers types cellulaires (Cocciolone et al. 2018; Duca et al. 2004; 2016; Senior, Griffin, et Mecham 1980; Le Page et al. 2019; L. Robert et Labat-Robert 2014; Tembely et al. 2022) (Figure 26).

Activity	Cell type
Chemotactic migration	Monocytes Fibroblasts SMCs
Modifications of ion fluxes	Fibroblasts
Increase of Ca <sup>++</sup> , Na <sup>+</sup> influx	SMCs
Decrease of K <sup>+</sup> influx	Mononuclear cells
Release of lysosomal enzymes	Mononuclear cells
Increased synthesis of membrane-bound matrix metalloproteases and elastases	Fibroblasts SMCs
Increased oxygen consumption	Mononuclear cells
Free radical release	
Induction of adhesion of cells to	SMCs
Cells to elastin fibers	Fibroblasts Malignant cells
Release of NO	Endothelial cells
Vasorelaxation	
Growth factor-like activity	Fibroblasts

Figure 26 - Activités biologiques, médiées par les peptides d'élastine via l'activation du récepteur d'élastine. (Ladislav Robert 2002; L. Robert et Labat-Robert 2014)

La tropoélastine n'est pas le seul élément issu de l'élastine possédant des propriétés biologiques. En effet, au cours du vieillissement ou dans certaines situations pathologiques, les fibres élastiques sont clivées par des protéases, ce qui libère des peptides d'élastine. (voir chapitre 2.3.6) (Duca et al. 2004; 2016; G. Faury 1998; Le Page et al. 2019). Ces peptides dérivés de l'élastine (EDP pour Elastin Derived Peptides) sont bioactifs car ils conservent certaines séquences peptidiques comme VGVAPG présente dans la TE. Ainsi, ils sont également pourvus de propriétés de signalisation. Les élastokines sont capables de moduler un grand nombre de processus cellulaires dont la chimiotaxie (Blood et al. 1988; Senior et al. 1984), la prolifération (Chatron-Colliet et al. 2015; Ghuysen-Itard, Robert, et Jacob 1992; Mochizuki, Brassart, et Hinek 2002; Tajima et al. 1997), la synthèse des protéases (Toupance et al. 2012; Fahem et al. 2008; Huet et al. 2002; Robinet et al. 2005), l'afflux d'ions (G. Faury, Usson, et al. 1998; M. P. Jacob et al. 1987), la migration (Robinet et al. 2005) et l'invasion cellulaire (Ntayi et al. 2004; Pocza et al. 2008) pour un nombre important de cellules normales et tumorales. De plus, les élastokines modulent la réponse inflammatoire (Baranek et al. 2007; T. Fulop, Khalil, et Larbi 2012) et sont impliquées dans le développement et/ou la progression de nombreuses pathologies telles que le cancer (Scandolera et al. 2016), le diabète (Blaise et al. 2013), la stéatohépatite non alcoolique (Romier et al. 2018), l'athérosclérose (Gayral et al. 2014) et la modulation de la thrombose artérielle (Kawecki et al. 2014). Les élastokines présentent également des effets bénéfiques, notamment de cardioprotection lors de phénomènes d'ischémie reperfusion (Robinet et al. 2007), dans le remodelage tissulaire et la cicatrisation des plaies (Antonicelli et al. 2009; Attia-Vigneau et al. 2014) (Figure 26) (Tembely et al. 2022). Les EDP présentent un effet sur l'ensemble des tissus à forte concentration d'élastine comme la peau ou les poumons et ils présentent également des effets sur le système immunitaire notamment un effet chimiotactique. Toutefois, nous nous focaliserons ici sur les effets des EDP sur le système cardiovasculaire :

- De façon intéressante, une étude de Mecham et collaborateurs a montré que, au cours du développement, la possibilité de réactivité cellulaire face aux peptides d'élastine apparaît en même temps que le début de la production d'élastine (Mecham et al. 1984).
- Les EDPs exercent un effet de migration cellulaire sur certaines cellules productrices d'élastines comme les CMLVs et les fibroblastes (Mecham et al. 1984; Ooyama et al. 1987). L'activité chimiotactique des EDPs a été signalée pour la première fois par l'équipe de Senior en 1980 (Senior, Griffin, et Mecham 1980). Karnik et ses collaborateurs (Karnik, Brooke, et al. 2003) ont montré qu'un domaine spécifique de la tropoélastine, le domaine VGVAPG, induit la polymérisation de l'actine dans les CMLVs et régule donc l'appareil contractile de ces derniers par une voie couplée à la protéine G. De plus, le peptide VGVAPG est un puissant chimio-attractant pour les CMLVs (Karnik, Brooke, et al. 2003), les fibroblastes et les monocytes (Senior et al. 1984; Senior, Griffin, et Mecham 1980).
- Les EDPs modulent le tonus vasculaire, Faury et al. ont étudié l'effet des  $\kappa$ -EDPs sur la vasodilatation d'anneaux aortiques de rat (G. Faury et al. 1995). Les résultats ont montré que les EDPs induisent une vasodilatation dépendante de l'endothélium. L'inhibition pharmacologique de la production d'oxyde nitrique (NO) ou de la cyclooxygénase empêche la vasodilatation induite par les EDPs. D'autres études menées par le même groupe ont permis d'affiner les séquences

d'EDPs responsables de la vasodilatation (G. Faury, Garnier, et al. 1998). Le peptide témoin VPVGGA et les séquences liées à l'EDPs VGVGVA, PGVGVA et GVGVA n'ont pas induit de vasodilatation, alors que la tropoélastine, VGV, PGV et VGVAPG ont induit une vasodilatation endothéliale et dose-dépendante. Il est intéressant de noter que le PVGV et le VGVA n'ont produit ces effets qu'à de faibles concentrations (G. Faury et al. 1995; G. Faury, Usson, et al. 1998; Z. Qin 2015)

- Les EDPs ont un effet stimulant sur la prolifération cellulaire. Ghuyesen-Itard et Robert en ont fait état dans des fibroblastes en 1992 (Ghuyesen-Itard, Robert, et Jacob 1992). De façon intéressante, Wachi et al. ont révélé, en utilisant des CMLVs de poussins, que ce processus est associé à une réduction de l'expression de la tropoélastine et de la synthèse de l'élastine (H. Wachi et al. 1995)

Des études sur des souris KO pour le gène de l'élastine (*Eln*<sup>-/-</sup>) montrent que l'ajout de TE au milieu de culture inhibe la prolifération (Karnik, Brooke, et al. 2003) et augmente la rigidité de CMLVs en culture. En effet, le module d'élasticité de CMLVs provenant de souris déficientes en élastines (*Eln*<sup>-/-</sup>) a été mesuré par microscopie à force atomique montrant une réduction du module d'élasticité des animaux *Eln*<sup>-/-</sup> de 40% en comparaison des animaux contrôles. L'ajout d'élastine soluble dans le milieu corrige cette différence (Gabriela Espinosa et al. 2014).

- Les EDPs ont un effet sur l'angiogenèse, Robinet et al. ont observé que les  $\kappa$ -EPs et le VGVAPG augmentent l'angiogenèse dans les membranes chorio-allantoïques de poussins, stimulant la formation de tubes à partir de cellules endothéliales vasculaires et microvasculaires humaines dans une matrice de Matrigel et de collagène et augmentent la migration cellulaire dans un modèle de cicatrisation in vitro (Robinet et al. 2005).
- Les EDPs modulent l'activité des métalloprotéases. Brassart et al. ont signalé que les  $\kappa$ -EDPs ou le VGVAPG augmentent la production de MMP-2 dans une lignée cellulaire de fibrosarcome humain, HT-1080 (Brassart et al. 1998).

Différents récepteurs membranaires peuvent lier la TE, et les EDPs, comme la galectine-3 (Pocza et al. 2008), les intégrines  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$  et les intégrines  $\alpha v$  de façon plus générale ainsi que l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  (Bax et al. 2009; P. Lee et al. 2014; Bochicchio et al. 2021) et un récepteur insensible au lactose (Maeda et al. 2007). Cependant, la plupart des effets physiopathologiques rapportés jusqu'à présent pour les élastokines ont été attribués au complexe récepteur de l'élastine (ERC pour Elastin receptor complex) (Figure 27) (Duca et al. 2016; Scandolera et al. 2016; Wahart et al. 2019). L'ERC est composé de trois protéines : deux sous-unités liées à la membrane, la protéine protectrice/cathepsine A (PPCA) et la neuraminidase-1 (Neu-1), ainsi que de la protéine de liaison à l'élastine (EBP). L'EBP (également connue sous le nom de S-Gal) est une variante d'épissage de la  $\beta$ -galactosidase lysosomale qui présente deux sites de liaison fonctionnels :

- L'EBP conserve la capacité de lier les galactosides mais a perdu son activité enzymatique. La liaison de l'EBP avec les galactosides diminue l'affinité du site élastine pour les EDPs ou la TE et affaiblit la liaison entre EBP et Neu-1/PPCA, ce qui conduit à la libération des EDPs et à la dissociation de l'ERC. L'EBP se -

se dissocie alors du complexe, inhibant les effets biologiques de l'EDP (A. Hinek et al. 1993; Privitera et al. 1998).

- De plus, l'EBP possède une séquence de 32 peptides capable de lier la tropoélastine et les EDPs et est directement impliqué dans la génération de la transmission du signal intracellulaire (A. Hinek et al. 1988).

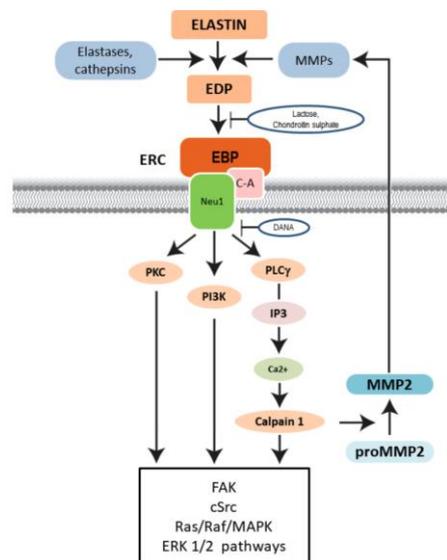
En dehors de son rôle au sein de l'ERC, l'EBP possède aussi, comme nous l'avons évoqué précédemment, sa fonction de chaperonne intracellulaire, liant et protégeant les monomères de TE lors du transport vers la surface cellulaire. C'est l'interaction antagoniste entre l'EBP et les galactosides qui libère la tropoélastine vers l'espace extracellulaire lorsque le complexe EBP/TE devient exposé en face externe de la membrane plasmique (Aleksander Hinek et al. 2006).

Le composant cathepsine A est une enzyme multifonctionnelle jouant un rôle important dans l'intégrité des fibres élastiques (Seyrantepe et al. 2008; L. Robert 1999). La PPCA lysosomale est une sérine carboxypeptidase qui agit comme une chaperonne et une protéine protectrice en aidant au routage intracellulaire, à la localisation et à l'activation lysosomale de NEU1 (Bonten et al. 1996; van der Spoel, Bonten, et d'Azzo 1998), et à la stabilisation de  $\beta$ -gal dans les lysosomes (Hoogeveen, Verheijen, et Galjaard 1983; Morreau et al. 1992). Outre sa fonction protectrice, la PPCA possède une activité enzymatique de type cathepsine A à pH acide et une activité désamidase/estérase à pH neutre (Morreau et al. 1992). Au sein de l'ERC, PPCA a une fonction protectrice similaire en maintenant l'intégrité des EBP (Malvagia et al. 2004) et, contrairement à NEU1, l'activité catalytique de PPCA n'est pas requise pour la transduction du signal à travers l'ERC (Duca et al. 2007).

Neu1 fait partie de la famille des sialidases capables d'éliminer les résidus d'acide sialique terminaux des glycoprotéines, des glycolipides et des oligosaccharides dans les lysosomes, ce qui conduit à la médiation des voies de transduction du signal de l'EDP qui peuvent être différentes dans les diverses cellules interagissant avec l'EDP (A. Hinek et al. 1988; Duca et al. 2007; Rusciani et al. 2010; Maurice et al. 2013). En plus d'être exprimé dans les lysosomes, NEU1 est également présent à la membrane plasmique où il régule une myriade de glycoprotéines membranaires par désialylation, telles que les intégrines (Uemura et al. 2009) les récepteurs tyrosine kinase (RTK) (Blaise et al. 2013; Jayanth et al. 2010; Lillehoj et al. 2012), les récepteurs Toll-like (TLR) (Amith et al. 2010; 2009) et la GPIb plaquettaire (Jansen et al. 2012), ce qui entraîne une modulation de l'activation des récepteurs et de la signalisation. Au sein de l'ERC, l'activité catalytique de NEU1 joue un rôle clé pour la transduction du signal par ce récepteur (Duca et al. 2007; Rusciani et al. 2010) et constitue la sous-unité catalytique de l'ERC.

Il existe plusieurs voies de signalisation intracellulaire déclenchées par l'EDP. Le complexe du récepteur de l'élastine est lié aux protéines G (Gi). Très souvent, l'EDP induit une augmentation intracellulaire du calcium et ceci est médié par la voie de la phospholipase C- $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) conduisant à la production d'inositol triphosphate (IP3) (Varga et al. 1988) comme cela a été trouvé dans les cellules immunitaires, plus spécifiquement dans les neutrophiles et les monocytes (Varga et al. 1989; 1990). Mochizuki *et al* ont ensuite confirmé l'implication des protéines Gai/o dans les voies de signalisation médiées par l'ERC dans les cellules musculaires lisses artérielles (Mochizuki, Brassart, et Hinek 2002). La voie de la protéine kinase C (PKC) peut également être stimulée, comme cela a été montré dans les cellules endothéliales

vasculaires humaines (L. Robert 1996). Plus récemment, il a été démontré que la voie du phosphoinositide 3-kinase (PI3K) est induite par l'EDP via l'activation de Neu1 et qu'elle joue un rôle important dans l'athérogénèse par l'activation des monocytes (Gayral et al. 2014) et dans la résistance à l'insuline induite dans les tissus hépatiques, musculaires et adipeux (Blaise et al. 2013). Dans les cellules musculaires lisses artérielles, il a été constaté que la signalisation induite par le récepteur de l'élastine déclenche l'activation des protéines G, l'ouverture des canaux calciques de type L et l'activation séquentielle des tyrosines kinases : Focal adhesion kinase (FAK), c-Src, la kinase du récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes, puis la cascade de phosphorylation Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2. Ces événements de phosphorylation conduisent à une prolifération accrue des cellules musculaires lisses artérielles et à une réorganisation du cytosquelette (Tembely et al. 2022). Ces voies de signalisation ont également été déclenchées dans les fibroblastes humains (Duca et al. 2007; Qa'aty et al. 2015; Aleksander Hinek et al. 2008). Une autre voie de signalisation dans laquelle les EDP jouent un rôle majeur est la voie des MAP Kinases-ERK1/2, MAP kinases capables d'ajouter des groupements phosphates à d'autres protéines pour les activer (division, croissance et prolifération cellulaires) (Duca et al. 2007; Mochizuki, Brassart, et Hinek 2002). Ils ont également mis en évidence deux voies différentes pouvant conduire à l'activation de MEK-ERK1/2, la première impliquant une production accrue d'AMPC et l'activation de la PKA, et la seconde agissant par l'activation de la PI3K. Il a été montré par la suite que la PI3K impliquée dans la signalisation ERC est l'isoforme PI3K $\gamma$  qui est activée par les sous-unités  $\beta\gamma$  d'une protéine Gi/o hétérotrimérique (Duca et al. 2005).



**Figure 27 - Genèse des peptides dérivés de l'élastine (EDP) et leur influence sur les fonctions cellulaires.** L'élastine est clivée par des protéases (élastases, cathepsines et métalloprotéinases matricielles (MMPs)) pour donner les EDPs. Les peptides interagissent ensuite avec le complexe récepteur de l'élastine (ERC) composé de la protéine de liaison à l'élastine, de Neu1 et de la cathepsine A. Les signaux provenant de l'ERC atteignent (entre autres) la protéine kinase C (PKC), la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et la phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), qui activent ensuite les voies de signalisation comprenant FAK, cSrc, Ras/Raf/MAPK ERK1/2. Le calcium (Ca<sup>2+</sup>) libéré du réticulum endoplasmique par l'IP3 participe à l'activation de la cystéine protéase calpaïne 1 qui par protéolyse limitée transforme la proMMP2 inactive en forme active (MMP2). Cette dernière quitte la cellule et pourrait augmenter le clivage de l'élastine dans un cercle vicieux. Le lactose, l'acide désoxy-2,3-déhydro-N-acétylneuraminique (DANA) et le sulfate de chondroïtine inhibent l'effet de l'EDP sur l'ERC, réduisant ainsi les conséquences (patho) physiologiques de la formation des EDPs. (Le Page et al. 2019)

En plus de son implication dans la génération d'acide sialique, NEU1 joue également un rôle central dans les voies de signalisation et les effets biologiques médiés par l'ERC par le biais de la désialylation des glycoprotéines membranaires à proximité de l'ERC (Tembely et al. 2022). Par exemple, Blaise et al. ont rapporté que l'administration chronique d'EDPs chez la souris favorise la résistance à l'insuline par la modulation du récepteur de l'insuline (IR) par l'ERC (Blaise et al. 2013). Par leur capacité à augmenter l'activité sialidase de la membrane NEU1, les élastokines se liant à l'ERC se sont également révélées capables de réguler les voies de signalisation d'autres RTKs, comme le récepteur du facteur de croissance hépatique (HGFR) (Romier et al. 2018). Les conséquences pathologiques des EDPs seront développées au paragraphe 3.2.4.

Il existe plusieurs antagonistes qui contrôlent les effets biologiques des EDPs par l'intermédiaire de l'ERC, comme le lactose, l'acide désoxy-2,3-déhydro-N-acetylneuraminique (DANA), le sulfate de chondroïtine (CS) et le peptide V14 (Z. Qin 2015). Le CS et le lactose s'opposent à la liaison de l'EDP sur l'EBP, tandis que le DANA bloque l'activité catalytique de Neu1 qui transmet le signal de l'interaction EDP-EBP (Figure 27) (Le Page et al. 2019).

D'autres protéines sont capables d'interagir avec la tropoélastine et les EDPs comme les intégrines. Les intégrines sont une superfamille de protéines d'adhésion cellulaire transmembranaires et leur rôle est de relier la MEC au cytosquelette cellulaire. Les intégrines jouent un rôle important dans la transduction des voies de signalisation intracellulaire, ainsi que dans les interactions avec les molécules de la MEC (Karamanos et al. 2021). Les intégrines forment des hétérodimères entre les sous-unités  $\alpha$  et les sous-unités  $\beta$ , avec au moins vingt-quatre combinaisons uniques. Les sous-unités  $\alpha$  des intégrines sont constituées de dix-huit types différents et les sous-unités  $\beta$  de huit types différents (Kechagia, Ivaska, et Roca-Cusachs 2019). Le domaine extracellulaire, en particulier le domaine  $\alpha$ 1, assure la spécificité du ligand avec plusieurs macromolécules ECM différentes ou des contre-récepteurs sur les surfaces cellulaires adjacentes. Il existe quatre catégories largement regroupées : (a) le motif arginine-glycine-acide aspartique, ou RGD, (b) les récepteurs de la laminine, (c) les récepteurs spécifiques des leucocytes, (d) les récepteurs du collagène (Karamanos et al. 2021).

La régulation de l'activité des intégrines a été découverte pour la première fois dans les cellules sanguines, leur activation nécessite la liaison de la queue cytoplasmique de la sous unité  $\beta$  de l'intégrine à la taline, une protéine du cytosquelette de 270 kDa (Miranti et Brugge 2002; Tadokoro et al. 2003). Les interactions cellule/MEC médiées par les intégrines déclenchent la formation de complexes et régulent les voies de signalisation en aval, comme l'activation des voies FAK, SRC, AKT et ERK et des petites GTPases de la famille RHO (Hamidi et Ivaska 2018; Karamanou et al. 2020). Ces voies sont cruciales pour le comportement cellulaire médié par les intégrines, comme la mort ou la survie cellulaire, la régulation de la dynamique du cytosquelette, la migration cellulaire via le contrôle de la polarité cellulaire, et l'intégrité des tissus (Horton et al. 2015). Comme nous l'avons vu précédemment les intégrines jouent un rôle crucial dans la synthèse des fibres élastiques en interagissant avec de nombreux éléments de la MEC. De plus, de façon intéressante, alors qu'il a longtemps été admis que la TE ne pouvait pas interagir directement avec les intégrines de la surface

cellulaire du fait de son absence de motif RGD. Rodgers et Weiss ont montrés dans une étude *in vitro* que la TE peut se lier directement à l'intégrine  $\alpha\beta3$ , par l'intermédiaire d'un site non RGD composé de 16 résidus d'acides aminés codés par l'exon 36 du gène de la TE (partie C-terminale) (Rodgers et Weiss 2004; Nonaka, Sato, et Wachi 2014, 36). Plus récemment, des études ont également montré que la tropoélastine était capable de se lier directement aux intégrines  $\alpha V$  ou encore  $\alpha5\beta1$  (P. Lee et al. 2014; Bochicchio et al. 2021).

## 2.5 Rôle structural et mécanique de la matrice extracellulaire

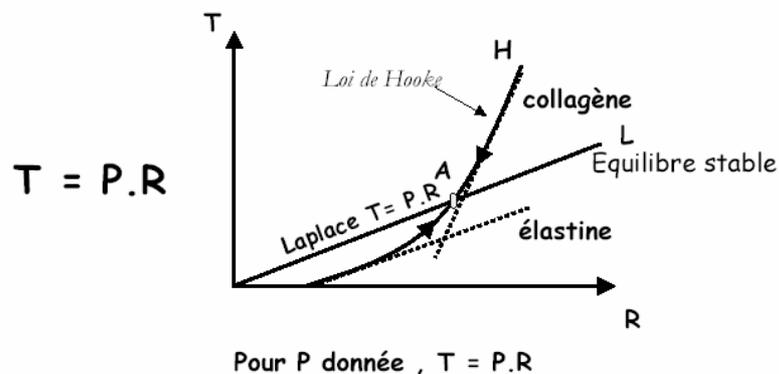
Du fait de la spécificité du muscle cardiaque, le flux de sang provenant du cœur est très pulsatile. Ainsi, sans adaptations, la pression sanguine et la vitesse d'écoulement dans l'arbre artériel augmenteraient et diminueraient au cours de chaque cycle cardiaque, atteignant des valeurs extrêmes bien éloignées de leurs valeurs moyennes. Idéalement, cependant, le flux sanguin vers et à travers les lits capillaires périphériques doit être régulier afin de minimiser les besoins en énergie hydraulique du cœur (un flux pulsatile est plus coûteux car la masse sanguine est accélérée et décélérée à chaque cycle) et de minimiser la force de traînée imposée par le flux aux cellules endothéliales qui tapissent les petits vaisseaux. La solution au problème de la pulsatilité est une solution mécanique complexe qui semble être commune à tous les systèmes circulatoires d'organismes complexes : des vaisseaux sanguins élastiques (Shadwick 1999; G. Faury 2001b).

Lors de la déformation d'un matériau à élasticité linéaire, un tracé de la contrainte appliquée (c'est-à-dire force/section transversale) en fonction de la déformation résultante (c'est-à-dire  $\Delta$ dimension/dimension initiale) donne une ligne droite dont la pente est le module d'élasticité de Young (mesure de la rigidité élastique du matériau) (Shadwick 1999). Un matériau ayant un module d'Young faible est moins rigide, et plus facilement déformable, qu'un matériau ayant un module d'Young élevé. Le comportement d'extension d'un cylindre comme un vaisseau est dicté par la loi dite de Laplace :

$$T = PR$$

Où T est la tension circonférentielle, P la pression et R le rayon interne du vaisseau (Avolio 2013; Shadwick 1999) (Figure 28). Cependant, comme la plupart des matériaux biologiques mous, les vaisseaux sanguins ne peuvent pas être considérés comme un matériau aux propriétés élastiques linéaires simples. Ils présentent plutôt un comportement non-linéaire lorsqu'ils sont distendus, de sorte que la rigidité élastique augmente avec le degré de charge, et il est plus approprié de caractériser ces propriétés à l'aide d'un module élastique exprimé en fonction de la déformation ou de la pression de distension. Le comportement biphasique de la paroi artérielle peut ainsi être illustré par la loi de Hooke qui stipule que la déformation élastique est une fonction linéaire des contraintes qui dépend des caractéristiques du matériau (Module de Young) (Figure 28). Ainsi, à faible pression, ce sont les fibres élastiques déformables qui permettent la dilatation du vaisseau (augmentation du rayon) sans augmentation majeure de la tension puis, au fur et à mesure que la pression augmente, donc que le rayon du vaisseau augmente, un transfert des contraintes se produit

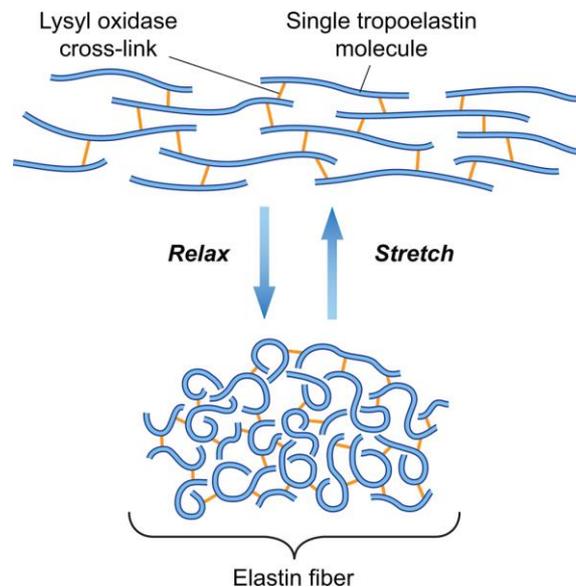
depuis les fibres élastiques vers les fibres de collagène, recrutées en nombre croissant. Les fibres de collagène résistent à l'étirement et, de ce fait, le rayon varie peu, permettant ainsi à la paroi artérielle de supporter une tension élevée avec une déformation minimale, limitant ainsi le risque de rupture (Figure 28) (Giudici, Wilkinson, et Khir 2021; Burton 1954; Roach et Burton 1957).



**Figure 28 - Diagramme illustrant les contributions relatives des fibres élastiques et des fibres de collagène aux propriétés mécaniques de la paroi artérielle.**

La paroi des vaisseaux sanguins est une structure composite qui tire ses propriétés non linéaires de l'assemblage de différents tissus possédant des propriétés différentes. Le comportement mécanique d'une artère varie sous l'effet de la pression intraluminale appliquée et reflète les propriétés mécaniques de ses constituants majeurs que sont l'élastine, le collagène et les cellules musculaires lisses. L'élastine et le collagène sont responsables des propriétés mécaniques passives de la paroi. Les cellules musculaires lisses forment quant à elles la composante physiologiquement active qui va pouvoir moduler la tension pariétale et/ou le diamètre des vaisseaux par l'intensité de la force de contraction développée. Le collagène et l'élastine exercent des effets opposés dans la paroi, la capacité à s'étirer d'un vaisseau sanguin dépend ainsi de la proportion et des interconnexions entre ces matériaux et de l'état de contraction des cellules musculaires lisses, de la pression transmurale, de son diamètre ou encore de sa longueur (Shadwick 1999; Giudici, Wilkinson, et Khir 2021).

L'élasticité, pour l'essentiel médiée par l'élastine dans le vaisseau, représente la capacité de ce dernier à se déformer puis reprendre sa forme initiale lorsque la contrainte ou la force qui l'étirait a cessé d'agir. C'est cette propriété qui permet le lissage de la pression et du flux sanguins discontinus et pulsatiles sortant du cœur, et assurent ainsi une perfusion continue des organes et tissus (effet Windkessel) (Cocciolone et al. 2018; G. Fauray 2001b). La force motrice qui sous-tend les propriétés élastiques de l'élastine sont entropiques, l'étirement diminue l'entropie et le retour élastique est due à un retour spontané à l'entropie maximale (Mithieux et Weiss 2005). La conformation rétractée de l'élastine est la position thermodynamique la plus stable. Ainsi, les fibres élastiques produisent une tension de résistance à la force de distension de la pression sanguine et permet un retour spontané de la paroi artérielle à sa conformation initiale sans dépense d'énergie (Figure 29). (Shadwick 1999; Mithieux et Weiss 2005).

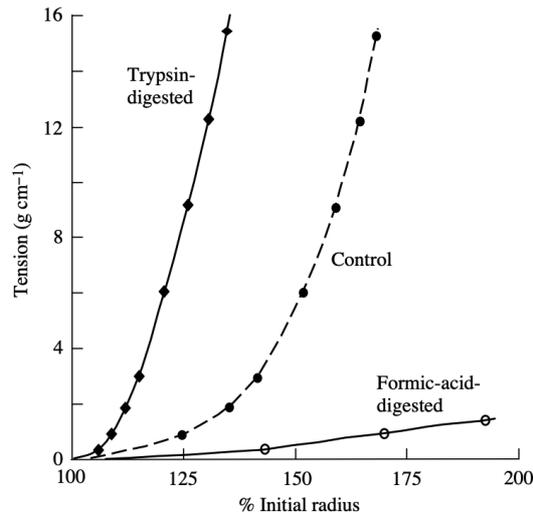


**Figure 29 - Schéma du réseau d'étirement et de retour des molécules d'élastine. Les molécules de TE sont reliées par des liaisons transversales (cross-links) établies par l'action des lysyl oxydases. Chaque monomère de TE peut individuellement se dilater et se contracter ce qui permet à la molécule d'élastine entière de s'étirer et de se rétracter comme une seule entité. (Moore et Thibeault 2012, Adapté de Alberts et al)**

L'élastine est une protéine semblable au caoutchouc, son module d'élasticité est d'environ 0,4 MPa, ce qui lui confère une importante capacité à s'étirer et revenir à sa position initiale. L'élastine est ainsi capable de s'étirer entre 100 et 220% de sa longueur initiale, limites au-delà de laquelle l'élastine présente des cassures et commence à rompre. Le module d'élasticité de l'unité lamellaire est légèrement supérieur à celui de l'élastine seule (05-07 MPa) du fait de la mince contribution des CMLVs (Aaron et Gosline 1981; Wassim Fhayli et al. 2019a; Wagenseil et Mecham 2009; Chow et al. 2014). Elle doit ses propriétés élastiques à la réticulation et à sa composition en résidus hydrophobes qui représentent près de 45% de ses acides aminés (Rosenbloom, Abrams, et Mecham 1993).

Les fibres de collagène quant à elles, résistent beaucoup mieux à l'extension que l'élastine, c'est d'ailleurs l'une des protéines les plus rigides de l'organisme. Son module d'élasticité est de 1 Gpa (environ 1000 fois supérieur à celui de l'élastine). A l'instar de l'élastine, ses propriétés mécaniques sont dues à un assemblage intra- et intermoléculaire spécifique (Wassim Fhayli et al. 2019a).

Différentes expérimentations ont été menées pour démontrer le caractère composite de la paroi artérielle et le rôle spécifique de chaque composant en fonction des contraintes exercées. Ainsi, Roach et Burton ont montrés l'importance de la nature composite de la paroi artérielle pour fournir la non-linéarité élastique. Ils ont démontré le rôle des lames élastiques dans la détermination des propriétés mécaniques à faible extension et l'implication du collagène dans l'augmentation de la rigidité au fur et à mesure de l'extension. En effet, en digérant sélectivement le collagène ou l'élastine d'échantillons d'artères humaines, ils ont découvert que la rigidité initiale de la paroi de l'artère représentait l'élasticité de l'élastine, tandis que la rigidité à des contraintes élevées représentait la contribution des fibres de collagène entièrement tendues (Shadwick 1999) (Figure 30).



**Figure 30 - Contributions de l'élastine et du collagène à la réponse tension-longueur des artères iliaques humaines. La courbe composée de losanges représente les propriétés du collagène lorsque l'élastine est éliminée par digestion à la trypsine. En revanche, la courbe composée de cercles ouverts représente les propriétés des fibres d'élastine lorsque le collagène est éliminé par digestion à l'acide formique. Enfin, la courbe en pointillés et cercles pleins correspond à une artère non traitée (Shadwick 1999, d'après Roach et Burton 1957)**

A faible pression ou étirement, ce sont les fibres élastiques qui vont être mises sous tension et progressivement étirées, limitant en contrepartie l'étirement des CMLV. De ce fait, les fibres élastiques confèrent une certaine rigidité à la paroi artérielle. En revanche, au fur et à mesure de la distension du vaisseau sous l'effet de la pression intraluminale, un nombre croissant de fibres de collagènes vont être recrutées. Leur extrême rigidité empêche cependant la paroi artérielle de s'étirer au-delà d'un point critique qui mettrait en péril son intégrité physique et particulièrement celle des fibres élastiques (Giudici, Wilkinson, et Khir 2021; Wolinsky et Glagov 1964; Burton 1954).

Les autres composantes de la paroi des artères élastiques, essentiellement les cellules endothéliales et les CMLVs, influencent faiblement les propriétés mécaniques passives (hors contraction cellulaire) de ces vaisseaux. Les cellules endothéliales présentent un impact indirect sur les propriétés mécaniques artérielles par la sécrétion de différents médiateurs qui modulent la fonction des CMLVs. Ces dernières affectent peu la distensibilité des grosses artères élastiques, mais essentiellement celle des artères de plus petits calibres voir chapitre 1.2.1.2 (Fhayli, Boëté et al. 2019; Dobrin et Rovick 1969; Qiu et al. 1995).

Différentes conditions peuvent aboutir à une dégradation des propriétés élastiques de la paroi artérielle. Que ce soit une perte d'élasticité innée lors de déficiences génétiques des constituants de la paroi, lors du vieillissement physiologique ou pathologique ou encore de pathologies acquises comme celle qui sont induites par l'hypoxie intermittente, reflet de l'apnée obstructive du sommeil. Le prochain chapitre fera l'objet de la description de ces différentes conditions et de ses répercussions sur le réseau cardio-vasculaire mais plus largement l'ensemble de l'organisme.

### 3 Altération des fibres élastiques et pathologies

La structure de la paroi artérielle est un système complexe en perpétuel remaniement au cours de la vie. Bien que sa composition soit en partie établie assez tôt au cours de la vie (notamment pour l'élastine dont la production s'arrête à la fin de l'adolescence), l'organisme va tout au long de sa vie être soumis à différentes modifications et/ou perturbations. Quelles soient innées ou acquises, aiguës ou chroniques, physiologiques ou pathologiques, ces modifications et/ou perturbations vont aboutir à une adaptation du système cardiovasculaire et potentiellement une modification de la paroi artérielle. L'un des éléments majeurs mis en cause dans le remaniement de la paroi artérielle est l'adaptation aux forces mécaniques qui s'exercent sur la paroi. Ces forces sont principalement les forces radiales et tangentielles provoquées sur toutes les cellules et la matrice extracellulaire de la paroi par l'éjection du sang engendré par la contraction du cœur en systole ainsi que les forces de cisaillement résultant de la friction du sang circulant sur la surface interne des vaisseaux, forces principalement ressenties par les cellules endothéliales. La structure de la paroi artérielle est modelée par les forces hémodynamiques imposées par le flux sanguin dépendant de la pression artérielle. A long terme, la sensibilité des cellules vasculaires aux forces régnant dans la paroi artérielle régule la croissance et la structure des artères. L'objectif de l'organisme étant de maintenir son homéostasie, celui de la paroi artérielle est son accommodation aux différentes conditions circulatoires, pathologiques ou non, et le maintien ou la restauration des niveaux de base de la tension des matériaux dans la paroi, de la pression sanguine et des forces de cisaillement, autour d'une valeur de référence garant d'une fonctionnalité optimale de la paroi artérielle (Langille 1996; 1993; Fhayli, Boëté et al. 2019). Si, des changements aiguës de ces différents paramètres peuvent être régulés de façon transitoire notamment par la réactivité des cellules vasculaires et l'ajustement subséquent du diamètre artériel (chapitre 1.1.3), en réponse à la libération de substances vasoactives et à la modulation du tonus myogénique des CMLVs, l'adaptation aux modifications chroniques est plus complexe. Soumis à de telles modifications chroniques, le vaisseau va devoir s'adapter en profondeur, provoquant une restructuration profonde de la géométrie et de la composition de la paroi. On parle alors de remodelage vasculaire pour décrire les transformations qui se produisent au sein du réseau vasculaire. Ce remodelage vasculaire est porté par la régulation de la synthèse et de l'organisation de la MEC, ainsi que par des modulations de la migration/organisation cellulaire ou encore de la synthèse/dégradation cellulaire.

Bien que majeur, le remodelage vasculaire n'est pas uniquement médié par l'hémodynamique, qu'elle soit innée comme une déficience génétique de l'un de ses constituants ou acquise lors de la contraction de pathologies (comme l'hypoxie intermittente par exemple) certaines conditions vont avoir des répercussions sur les vaisseaux, le cœur mais plus globalement sur l'ensemble de l'organisme.

Le remodelage vasculaire peut être la cause et/ou la conséquence de certaines pathologies cardiovasculaires. Ces dernières sont la principale cause de décès dans le monde et représentent de ce fait un problème majeur de santé publique (Townsend et al. 2022; GBD 2017 Causes of Death Collaborators 2018; « The Top 10 Causes of Death » s. d., 10). Nous évoquerons ici les principales conditions aboutissant à une altération du système cardio-vasculaire et plus particulièrement aux défauts de la

matrice extracellulaire entraînant une perte d'élasticité facteurs de maladies cardiovasculaires.

### **3.1 Le vieillissement artériel normal**

Le vieillissement est un processus associé à des altérations structurelles et fonctionnelles des tissus et des organes qui, avec le temps, conduisent à divers déficits fonctionnels associées à l'âge (Mammoto, Matus, et Mammoto 2022). Bien que parfois défini comme un processus physiologique car inéluctable avec l'accumulation des années, certains auteurs militent pour que le vieillissement, et plus particulièrement ses conséquences cardiovasculaires soient reconnues comme une pathologie dans la médecine clinique, selon l'auteur : « le vieillissement est une manifestation de l'échec progressif, dépendant du temps, des mécanismes moléculaires qui créent le désordre dans un système d'ADN et son environnement (nucléaire, cytosolique, tissu, organe, organisme, autres organismes, société, terre ferme, atmosphère, univers). » (Lakatta 2015).

Le vieillissement est un processus multifactoriel défini comme la conséquence de la perte de fonction, de résistance et d'adaptabilité au stress en fonction du temps dans tous les organes (Duca et al. 2016). Le vieillissement est la résultante des effets combinés de facteurs génétiques (vieillissement intrinsèque) et de facteurs environnementaux qui peuvent être adaptés selon le mode de vie tels que le régime alimentaire, l'activité physique, le stress (vieillissement extrinsèque) auxquels est soumis l'organisme tout au long de sa vie. Il s'agit d'un processus lent et progressif qui affecte toute la population. Au cours du vieillissement, ce sont tous les aspects de la signalisation cellulaire qui deviennent désordonnés avec l'âge : les signaux changent tout comme leur détection, leur transmission ou encore la réponse qui est apportée à ces signaux (Lakatta 2015). Le système circulatoire, qui fait appel à des tissus élastiques, présente un déclin relativement rapide comparé à d'autres fonctions de l'organisme, comme la fonction nerveuse par exemple représentée dans la Figure 31 par la vitesse de conduction nerveuse qui subit une altération plus lente avec l'âge. En réponse au désordre progressif qui s'installe, les cellules cardiovasculaires génèrent une défense inflammatoire pour tenter de limiter le désordre moléculaire. Cependant cette réponse inflammatoire va provoquer des modifications du phénotype des cellules endothéliales, des CMLVs et des cellules cardiaques avec pour conséquence la production de cytokines inflammatoires qui vont favoriser ce processus inflammatoire. Cette inflammation, induite par les troubles moléculaires liés à l'âge qui s'accumulent dans le cœur et les artères, évolue dans un premier temps à bas bruit et ne provoque pas en soi de signes ou de symptômes cliniques de maladies cardiovasculaires. Les signes et symptômes cliniques de ces maladies cardiovasculaires comme l'hypertension ou l'athérosclérose commencent cependant à apparaître lorsque l'inflammation associée à l'âge dans le cœur et les artères dépasse un certain seuil (Lakatta 2015)

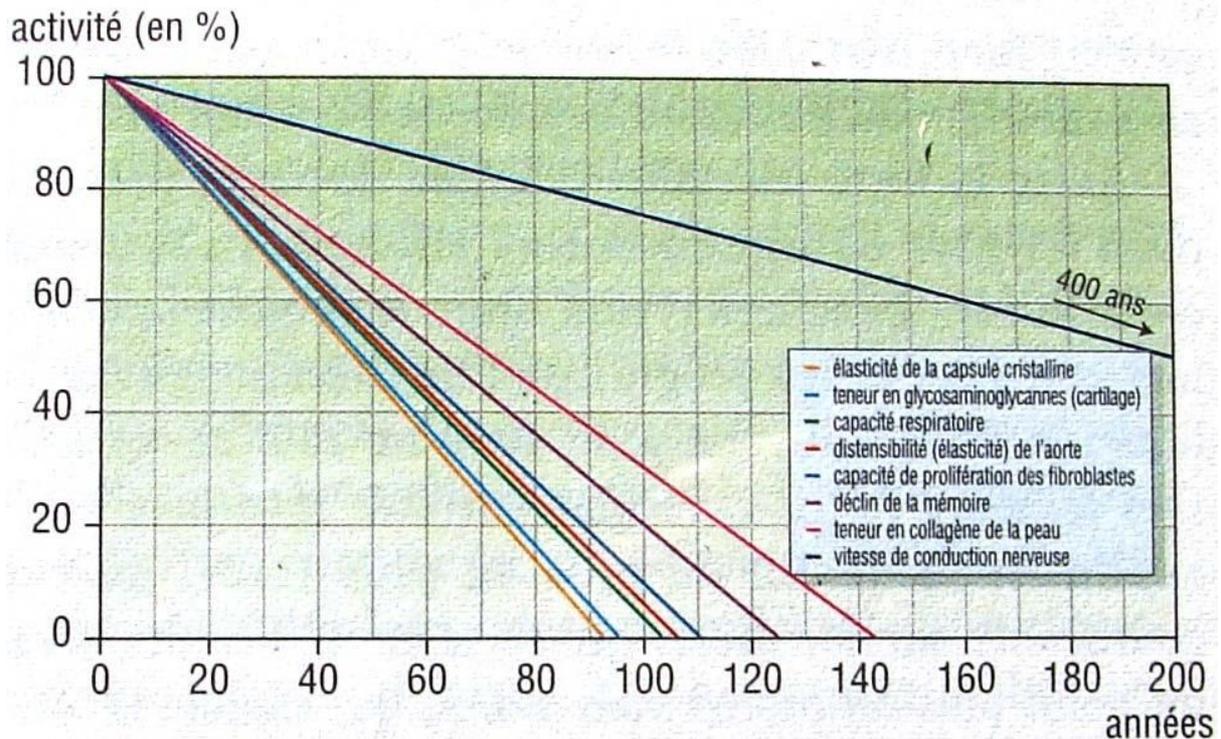
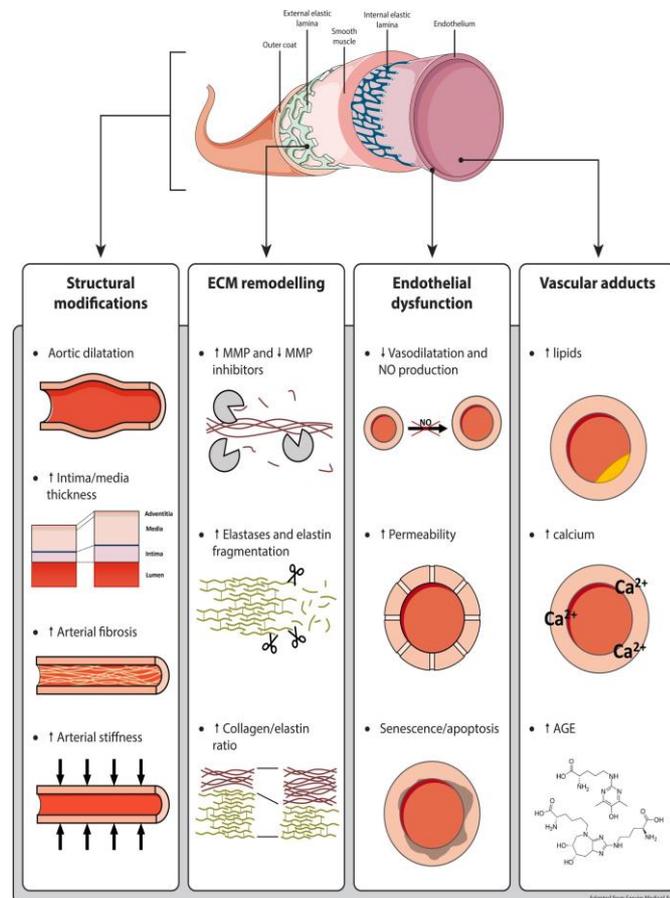


Figure 31 - Diagramme représentant le déclin des principales fonctions de l'organisme. « Le vieillissement faits et théories. » L. Robert, 1995

Au fil des ans, l'espérance de vie a considérablement augmenté dans le monde entier, et la prévalence des maladies cardiovasculaires (1<sup>ère</sup> cause de décès à l'échelle planétaire provoquant 17,8 millions de décès dans le monde en 2017 et prêt de 4 millions de personnes par an en Europe) augmente inévitablement avec le vieillissement croissant de la population (GBD 2017 Risk Factor Collaborators 2018; Townsend et al. 2022). Le compartiment artériel subit les modifications parmi les plus importantes au cours du vieillissement, qui seront détaillées par la suite, ce qui en fait un facteur de risque majeur des maladies cardiovasculaires (Izzo et al. 2018; Lakatta 2015). Le vieillissement artériel est caractérisé par une augmentation de la rigidité, une réduction de l'élasticité, une altération de la distensibilité provoqué entre autre par une diminution du ratio élastine/collagène, un dysfonctionnement endothélial, une migration et une prolifération accrue des CMLVs, et une dérégulation du tonus vasculaire (Mammoto, Matus, et Mammoto 2022; Paneni, Costantino, et Cosentino 2015; Fhayli, Boëté et al. 2019).

Au cours du vieillissement, les fibres élastiques de la paroi artérielle sont progressivement fragmentées et perdent leurs propriétés élastiques d'origine en raison des charges mécaniques exercées tout au long de la vie due à des processus mécaniques (fatigue des fibres élastiques) et enzymatiques par action de diverses élastases et métalloprotéases matricielles (MMP) (Fhayli, Boëté et al. 2019). Cette fragmentation de l'élastine a d'autant plus d'impact que les fibres élastiques ne sont plus synthétisées après l'adolescence, elles ne sont donc ni remplacées ni réparées, de plus la dégradation de l'élastine va libérer des EDPs qui peuvent avoir des conséquences pathologiques (voir chapitre 3.2.4). Le vieillissement artériel est

également accompagné d'une inflammation chronique de bas bruit (Duca et al. 2016; Heinz 2021; Lakatta 2015) (Figure 32).



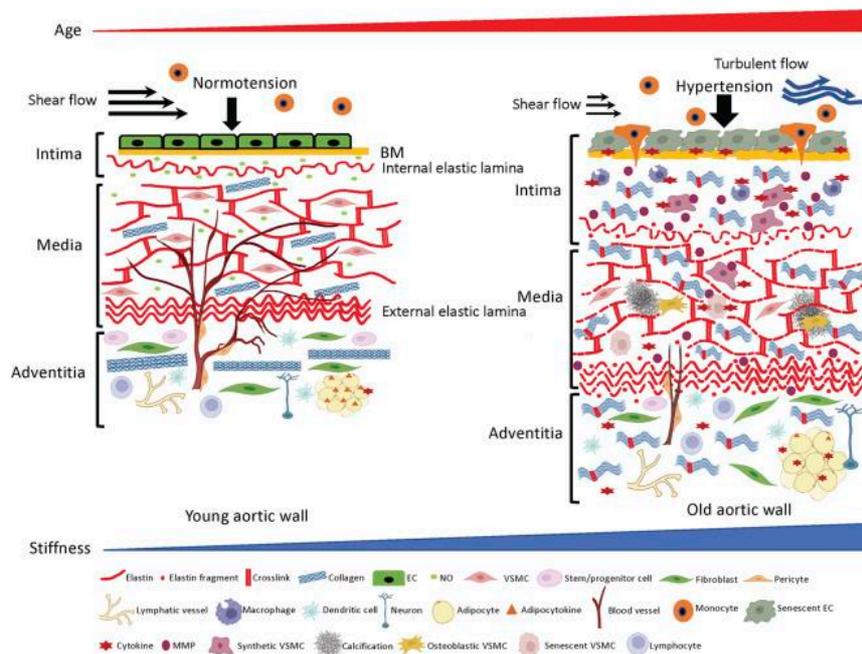
**Figure 32 - Événements moléculaires et cellulaires survenant au cours du vieillissement vasculaire. Comme le montre la figure, le vieillissement est associé à des modifications critiques de la paroi vasculaire avec des altérations structurelles, un remodelage de la matrice extracellulaire, un dysfonctionnement endothélial et des dépôts de lipides, de calcium et de produits finaux de glycation avancée (AGE). Tous ces événements contribuent à diminuer la compliance, la résilience et à augmenter la rigidité des artères de conductance âgées. ECM, matrice extracellulaire ; MMP, métalloprotéinases matricielles ; NO, oxyde nitrique ; AGE, produits finaux de glycation avancée. (Duca et al. 2016)**

Du point de vue morphologique, le vieillissement des artères est caractérisé par une dilatation, un aspect tortueux et un épaississement de la paroi vasculaire résultant d'un remodelage structurel de la MEC et d'une dérégulation du fonctionnement des CMLV (Lakatta et Levy 2003; J. A. Collins et al. 2014). Les artères subissent un remodelage structural (artériosclérose) modifiant leur composition protéique. Des changements se produisent en particulier sur les deux protéines matricielles les plus abondantes de la paroi des vaisseaux, le collagène et l'élastine, ce qui contribue également à augmenter la rigidité vasculaire, principalement artérielle. Roach et Burton ont montré, grâce à leur expérimentation dès 1957 (Figure 30), que l'augmentation de la rigidité artérielle chez l'Homme avec l'âge peut être corrélée non seulement à une augmentation relative du collagène, mais aussi à une perte de la phase initiale de faible compliance, dominée par l'élastine, ce qui fait que la charge du collagène se produit à des

contraintes circonférentielles plus faibles (Shadwick 1999). La teneur en collagène augmente en effet avec l'âge, entraînant une réduction correspondante de l'élastine avec une augmentation du ratio collagène/élastine, transférant une partie de la charge mécanique aux fibres de collagène, qui sont environ 1000 fois plus rigides que les fibres élastiques (~0,4 MPa pour l'élastine et ~1GPa pour les collagènes) (Fhayli, Boëté et al. 2019). Outre la diminution de la teneur en élastine liée à l'âge, la structure des lame élastiques se modifie au cours du vieillissement, notamment en raison des cycles de charges/décharges mécaniques répétées à chaque cycle cardiaque et ceci quelques milliards de fois au cours d'une vie et du stress oxydatif, présentant des signes évidents de fragmentation et de rupture (Greenwald 2007). La migration et la prolifération des CMLVs de la média, qui passent d'un phénotype contractile à un phénotype synthétique, prolifératif, mitotique et migratoire, entraînent un remodelage de l'intima et de la média. Ce phénomène s'accompagne d'une augmentation progressive du diamètre de la lumière et d'un allongement des vaisseaux entraînant une tortuosité. Parallèlement, différents facteurs environnementaux (principalement le glucose, les lipides et le calcium) vont se fixer aux fibres élastiques ce qui modifie les interactions moléculaires et rigidifie les fibres élastiques. La calcification progressive de l'élastine de la paroi artérielle au cours du vieillissement potentialise la rétention et la fixation du cholestérol à la surface des fibres élastiques (Shao, Cai, et Towler 2006; Wassim Fhayli et al. 2019a; Greenwald 2007). Les molécules de collagène quant à elles acquièrent progressivement des liaisons croisées (cross-link) via la formation de produits finaux de glycation avancée (AGEs). Les AGEs sont les produits de la réaction de glycation et d'oxydation entre les sucres et les groupes amino de certaines protéines (réaction de Maillard), l'accumulation des AGEs altère les propriétés structurales et fonctionnelles du collagène et augmente sa rigidité (Aronson 2003; Greenwald 2007). De plus, lorsque les artères vieillissent ou subissent des modifications pathologiques, l'équilibre entre les protéases et leurs inhibiteurs tissulaires (TIMPs) est dégradé et la libération de protéases augmente par l'induction de l'expression génétique des métalloprotéinases matricielles (MMP), par l'activation des zymogènes ou par la sécrétion d'enzymes par les cellules inflammatoires. Cette augmentation chronique de l'activité des MMP joue un rôle central dans le remodelage structurel artériel associé à l'âge, en particulier en accroissant la dégradation des fibres élastiques. Il a été démontré que le vieillissement augmente l'activité des MMP-2/-7/-9/-14 dans les parois aortiques des rongeurs, des primates non-humains et des humains (M. Wang et al. 2015). Enfin, un autre processus déterminant du vieillissement vasculaire est l'augmentation du stress oxydatif et de l'inflammation. En effet, le vieillissement est associé à un état pro-inflammatoire chronique de bas grade (Franceschi et al. 2007). De nombreuses études ont démontré une augmentation des marqueurs inflammatoires systémiques via le dysfonctionnement de certaines voies de signalisation comme celles de l'angiotensine II, l'aldostérone et l'endothéline-1 au cours du vieillissement, en plus des facteurs de transcription, des intégrines et des protéases pro-inflammatoires. (M. Wang et al. 2014) Le vieillissement génère également un excès de radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS pour reactive

oxygen species) notamment *via* la dérégulation de la NAPDH oxydase. Ce phénomène s'ajoute à la diminution de la biodisponibilité du NO du fait de la dysfonction endothéliale puisque l'oxyde nitrique (NO) produit va réagir avec les ROS, notamment l'ion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) pour produire du peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>), molécule oxydante capable de provoquer des dommages cellulaires ou de l'ADN. Ce phénomène qui compromet l'activité vasodilatatrice de l'oxyde nitrique joue un rôle critique dans le dysfonctionnement vasculaire (El Assar, Angulo, et Rodríguez-Mañás 2013; M. Wang et al. 2014).

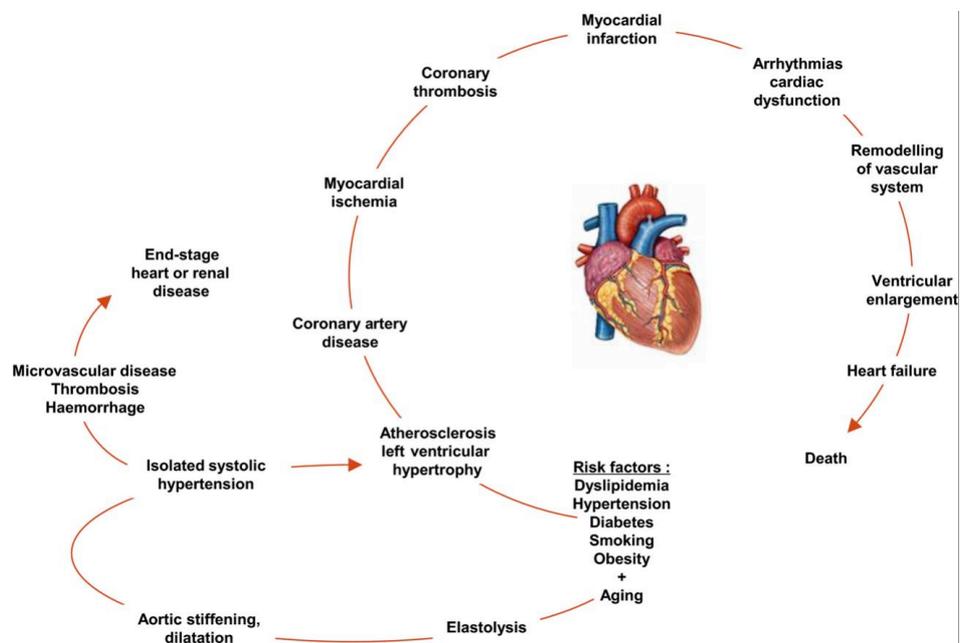
La fonction de lissage du flux sanguin des artères et l'hémodynamique vont alors être altérées, la perfusion des organes étant alors dégradée, avec de graves conséquences pour l'organisme telles qu'une augmentation du travail cardiaque entraînant une hypertrophie du ventricule gauche potentiellement responsable d'une insuffisance cardiaque parallèlement à une ischémie chronique des tissus périphériques (Pezet et al. 2009; O'Rourke et Hashimoto 2007; Fhayli, Boëté et al. 2019). L'ensemble de ces événements liés au vieillissement de la paroi aortique prédispose aux maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose (par la formation de plaque athéromateuse et de cellules spumeuses) ou les anévrismes (Figure 33) (Mammoto, Matus, et Mammoto 2022).



**Figure 33 - Structuration de la matrice extracellulaire et des composants cellulaires dans la paroi aortique en fonction de l'âge. Paroi aortique jeune (à gauche) : dans l'intima, les cellules endothéliales (CE) maintiennent l'homéostasie de la paroi en formant une structure de barrière sans faille sur la membrane basale (BM) et en produisant des facteurs vasoprotecteurs tels que le monoxyde d'azote (NO). Dans la média, les molécules clés de la MEC (par exemple, l'élastine, le collagène) et les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC) maintiennent le tonus et la compliance vasculaires. Dans l'adventice, les fibres de collagène soutiennent la paroi aortique pour éviter la sur-expansion. Paroi aortique âgée (à droite) : le vieillissement induit la sénescence des CE, ce qui entraîne une inflammation chronique de bas grade et un remodelage aberrant de la MEC (fragmentation de l'élastine, dépôt excessif de collagène et leur réticulation) dans l'intima et la média. De plus, les fibroblastes de l'adventice rigidifient directement ou indirectement la paroi aortique en produisant et déposant un excès de collagène. (Mammoto, Matus, et Mammoto 2022)**

### 3.1.1 Mécanismes moléculaires du vieillissement artériel

O'Rourke et ses collaborateurs ont définis ce qu'ils appellent le continuum du vieillissement vasculaire qui décrit une séquence d'évènements allant des facteurs de risque cardiovasculaires (dyslipidémie, hypertension, obésité) auxquels s'ajoutent la dégradation des fibres élastiques et l'augmentation de la rigidité vasculaire survenant au cours du vieillissement à la cardiopathie terminale (O'Rourke, Safar, et Dzau 2010; Wahart et al. 2019). Nous nous intéresserons ici particulièrement aux mécanismes provoqués par le vieillissement. Dans un premier temps, se met en place un phénomène d'élastolyse induit par un processus de fatigue de la paroi artérielle du fait de la répétition des cycles cardiaques. Différents mécanismes physiopathologiques viennent renforcer ce phénomène de fatigue tel que la calcification, la glycation, l'action de protéases et la peroxydation lipidique entraînant une augmentation de la rigidité artérielle. De plus, les aldéhydes générés par la peroxydation des acides gras polyinsaturés, ont été décrits comme liant l'élastine et induisant une perte de flexibilité, et une conformation altérée conduisant à une sensibilité accrue à la digestion enzymatique (Tanaka et al. 2001; Yamamoto et al. 2002; Zarkovic et al. 2015). Des liaisons croisées non enzymatiques de l'élastine avec des produits finaux de glycation avancée (AGE) et, plus récemment, des produits de carbamylation ont également été signalés dans le processus de rigidification vasculaire (Konova et al. 2004; Gorisse et al. 2016). Tous ces composés vont contribuer à la perte d'élasticité, à fragilité et à la fragmentation de l'élastine qui est encore amplifiée par l'inflammation et la sécrétion ultérieure de métallo-protéinases matricielles (MMP) ainsi que la diminution des Tissus inhibiteurs des métalloprotéinases (TIMPs) (Figure 32, Figure 34) (Fhayli, Boëté et al. 2019; Duca et al. 2016; Mammoto, Matus, et Mammoto 2022; Wang et al. 2015; Gargiulo et al. 2014).



**Figure 34 - Le continuum du vieillissement vasculaire (adapté de O'Rourke (O'Rourke, Safar, et Dzau 2010)). Ce continuum présente des évènements interconnectés allant des facteurs de risque cardiovasculaire, tels que le diabète ou l'hypertension, à la cardiopathie terminale. Il a été élargi par le rôle joué par le vieillissement qui se manifeste principalement par la dégradation des fibres élastiques, entraînant la rigidité artérielle et sa participation au continuum délétère. (Wahart et al. 2019)**

### 3.1.1.1 Causes mécaniques de l'endommagement des fibres élastiques artérielles

L'élastine est une protéine particulièrement résistante aux attaques chimiques et physiques et extrêmement stable. Sa demi-vie étant estimée à environ 70 ans, sa synthèse initiale devrait généralement être suffisante pour assurer ses fonctions jusqu'à un âge avancé (Sherratt 2009; Labat-Robert, Bihari-Varga, et Robert 1990; Lillie, Chalmers, et Gosline 1994). Cependant, même en l'absence de pathologies, l'élastine est soumise continuellement à des contraintes mécaniques (plus de 3 milliards de cycles au cours de la vie). En effet, si l'on suppose une fréquence de contraction moyenne de 75 par minute, un cœur humain se contracte environ 108 000 fois en 24h, plus de 39 millions de fois en un an et près de 3 milliards de fois au cours d'une vie de 75 ans. De façon intéressante, une étude de Levine montre que l'espérance de vie des mammifères est corrélée à leur fréquence cardiaque de repos, la plus petite espérance de vie est observée chez la souris (qui à la fréquence cardiaque la plus élevée ~600 battements par minutes) alors que l'espérance de vie la plus longue est observée chez la baleine (~15 battements par minutes). Cette étude montre l'importance des contraintes mécaniques répétitives exercées sur le système cardiovasculaire mais montre également à quel point l'espèce humaine est à part. Si les humains des périodes précédant le 18<sup>e</sup> siècle pouvaient s'intégrer dans ce graphique, ce n'est pas le cas de l'espèce humaine moderne du fait de l'évolution de la médecine et du mode de vie de façon générale. La durée de vie de l'être humain moderne est beaucoup plus élevée que celle prédite par leur fréquence cardiaque au repos, ce qui peut expliquer les conséquences cardiovasculaires du vieillissement (Levine 1997; Thorin-Trescases et Thorin 2016).

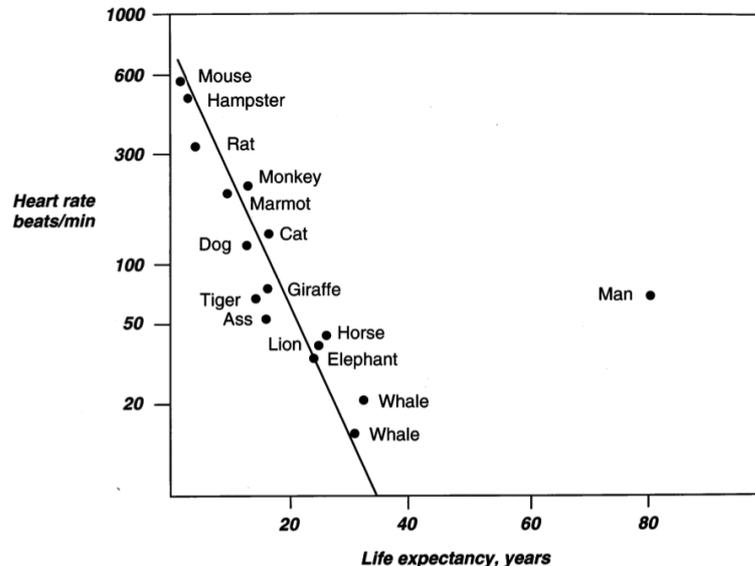


Figure 35 - Relation entre la fréquence cardiaque au repos et l'espérance de vie chez les mammifères. (Levine 1997)

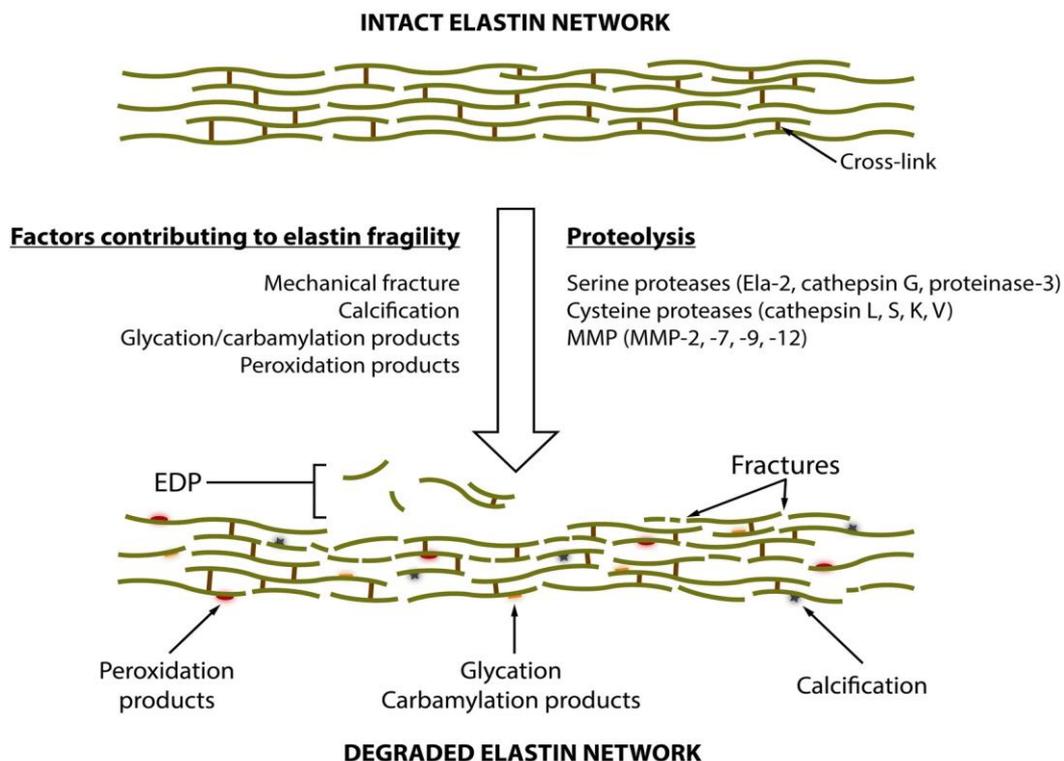
Chaque battement cardiaque impose une variation de pression de 30-40 mmHg pour un jeune adulte en bonne santé qui génère un changement de volume des vaisseaux. Cette répétition de cycles d'extension/rétraction génère de fortes contraintes qui

finissent par provoquer une usure des composants cellulaires ou extracellulaire de la paroi artérielle. Ces contraintes vont provoquer une détérioration progressive de la structure et de la fonction vasculaire en particulier des lames élastiques accompagnée d'une dégénérescence de la média, d'une rigidification et d'une dilatation des vaisseaux, en particulier de l'aorte proximale. De plus, l'augmentation de la rigidité artérielle liée en partie à cette usure des lames élastiques mais également à d'autres phénomènes comme leur dégradation par les protéases ou encore le décalage de l'onde de pression réfléchie vont favoriser l'apparition d'une hypertension artérielle augmentant la variation de pression subie par la paroi à chaque cycle et accélérant son endommagement mécanique (Thorin-Trescases et Thorin 2016; Fhayli, Boëté et al. 2019).

### 3.1.1.2 Protéases

L'élastine et les autres composants des fibres élastiques peuvent être dégradés par des enzymes protéolytiques : les élastases.

Les élastases sont des endopeptidases qui clivent l'élastine insoluble et soluble, comprenant des protéinases à sérine ou à cystéine et des métalloprotéinases (Maurice et al. 2013; Duca et al. 2016) (Figure 36).



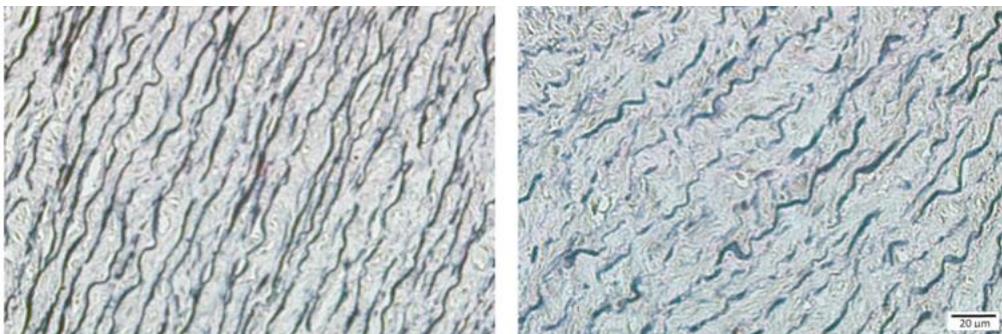
**Figure 36- Remodelage de l'élastine au cours du vieillissement vasculaire. Au cours du vieillissement, l'élastine est soumise à un remodelage et à une fragmentation. Différents facteurs peuvent contribuer à la fragilité et à la rupture de l'élastine, comme la fracture mécanique, la calcification, la glycation, la carbamylation et la peroxydation. En outre, ces facteurs augmentent la sensibilité de l'élastine à la protéolyse par des élastases spécifiques telles que les sérines, les cystéines et les métalloprotéinases matricielles (MMP). Ela-2, élastase neutrophile ; MMP, métalloprotéinases matricielles ; EDP, peptides dérivés de l'élastine. (Duca et al. 2016)**

Les protéinases à sérine, comme l'élastase des neutrophiles (Ela-2), la cathepsine G, et la protéinase-3 (myéloblastine), sont principalement exprimées par les neutrophiles polynucléaires et les CMLVs. Quatre membres de la famille des cathepsines sont des protéinases à cystéine (cathepsines L, S, K et V) qui présentent une activité élastinolytique et sont aussi principalement produits par les macrophages et les CMLVs. Enfin, quatre MMP sont connues comme étant des élastases : la gélatinase A (MMP-2), la matrilysine (MMP-7), la gélatinase B (MMP-9) et l'élastase des macrophages (MMP-12). Alors que les gélatinases sont exprimées de manière ubiquitaire, MMP-7 et MMP-12 sont principalement produites par les macrophages (Maurice et al. 2013; Duca et al. 2016).

La synthèse, l'activation et l'inactivation des élastases peuvent résulter de l'action de nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques ou du déficit ou excès d'inhibiteurs spécifiques (Fhayli, Boëté et al. 2019):

- Les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMP pour tissue inhibitor of metalloprotease) sont présents de façon constitutive dans la paroi vasculaire et régulent l'activité des MMP limitant la dégradation des fibres élastiques (Chakraborti et al. 2003)
- L'élafine est, quant à elle, un puissant inhibiteur des protéases à sérines dérivés des neutrophiles, de l'élastase ou encore de la protéinase-3 par un mécanisme de liaison compétitive. Elle est, en outre, capable d'inhiber l'élastase vasculaire endogène (EVE), une sérine protéase produite par les tissus vasculaires endommagés (Shaw et Wiedow 2011)

Avec l'âge, la balance protéases/inhibiteurs est progressivement dérégulée ce qui va favoriser la dégradation des fibres élastiques, dont la synthèse à l'âge adulte est quasiment nulle. La production de collagène étant elle toujours active jusqu'à un âge avancé, l'ensemble de ces phénomènes contribue à l'augmentation du rapport collagène/élastine et à la rigidité artérielle (Wassim Fhayli et al. 2019a; Cai et al. 2021). Les fibres élastiques apparaissent alors progressivement plus fines, désorganisées et fragmentées, ce qui provoque un épaississement de la paroi en raison, entre autres, d'une production compensatoire de collagène, et une diminution de l'élasticité. Les artères apparaissent alors élargies car moins apte à résister à la pression sanguine exercée sur la paroi (Figure 37) (Taghizadeh et Tafazzoli-Shadpour 2017; Cattell, Anderson, et Hasleton 1996; L. Robert, Robert, et Fülöp 2008).



**Figure 37 – Coupe de la média aortique d'échantillons d'une aorte d'un individu jeune (panneau de gauche) et d'une aorte d'un individu âgé (panneau de droite). Les lames élastiques et les couches interlamellaires sont visibles en couleurs sombres et claires respectivement. Les lames élastiques (régions sombres) apparaissent mieux arrangées et continues dans l'aorte jeune alors que ces lames sont fragmentées et perturbées dans l'aorte âgée. (Taghizadeh et Tafazzoli-Shadpour 2017)**

La dégradation de l'élastine par les élastases génère des peptides dérivés de l'élastine (EDP) provoquant eux-mêmes de nombreux effets biologiques (chapitre 2.3.6).

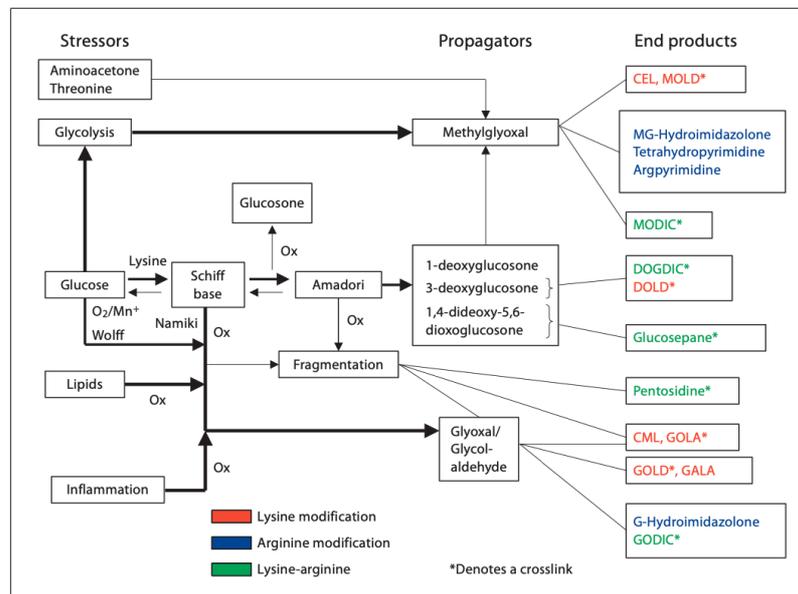
### **3.1.1.3 Calcifications**

En plus des dommages causés par la répétition des contraintes mécaniques et de la dégradation chimique, la calcification des artères peut augmenter la rigidité du tissu élastique restant. La calcification de la média touche particulièrement les grandes artères élastiques plutôt que les artères musculaires et augmente significativement avec le vieillissement notamment en lien avec plusieurs affections, impactant le métabolisme phosphocalcique, couramment observées chez les personnes âgées (insuffisance rénale chronique, ostéoporose ...). On observe chez ces patients une augmentation de la concentration sérique en calcium (Ca) et en phosphore (P) qui provoque la déposition de phosphates de calcium dans la paroi artérielle (Villa-Belloc 2020). Une étude a montré que le contenu en élastine est un déterminant essentiel de la calcification médiane artérielle. En effet, cette étude montre que la calcification médiane de souris, dépourvues de la protéine matricielle Gla (Mgp), un puissant inhibiteur de la calcification des tissus mous, est bien supérieure à la calcification de la paroi des souris déficientes à la fois pour cette protéine (*Mgp*<sup>-/-</sup>) et haploinsuffisantes pour l'élastine (*El*<sup>n+/+</sup>). De plus, la quantité de minéraux déposés dans les artères des souris s'échelonne avec la quantité d'élastine dans l'arbre vasculaire, la quantité de dépôts calciques diminuant parallèlement à la quantité d'élastine (Khavandgar et al. 2014). La calcification de la paroi, y compris des fibres élastiques, induit une rigidification artérielle, une forte corrélation entre la teneur en calcium et la rigidité artérielle a été établie chez l'Homme (Dao et al. 2005; Shao, Cai, et Towler 2006). L'élastine possède plusieurs sites de nucléation pour les minéraux d'apatites favorisant l'accumulation de calcium. Une corrélation positive a été démontrée entre l'étendue de la calcification et le degré de fragmentation de l'élastine. (Schiffmann et al. 1969; Perrotta et al. 2011).

### **3.1.1.4 Produits finaux de glycation avancée (Advanced Glycation End-products ou AGE)**

La rigidité de l'élastine est également augmentée par la réticulation. En raison de leur longue vie biologique, l'élastine et le collagène sont exposés à diverses modifications post-traductionnelles enzymatiques et non enzymatiques qui peuvent contribuer à des altérations fonctionnelles et structurelles de leurs propriétés. La réaction non-enzymatique la plus courante est la glycation non-enzymatique. Le glucose, présent dans la circulation sanguine et essentiel dans son rôle de métabolite énergétique, réagit spontanément (réaction non-enzymatique) avec les groupements amines (-NH<sub>2</sub>) libres des acides aminés pour former une base de Schiff (imine comportant une double liaison C-N avec l'atome d'azote lié à un groupement aryle ou alkyle). Cette base de Schiff se réarrange en un produit d'Amadori (glycosamine stable, responsable notamment dans la formation de l'hémoglobine glyquée HbA<sub>1c</sub>), c'est ce que l'on appelle la réaction de Maillard. A son tour, ce produit peut subir une autre série des réactions complexes comportant déshydratation, condensation, fragmentation et la formation des liaisons de pontage pour former les AGE Advanced Glycation End-products (AGE) ou produits de Maillard, il en existe plus d'une dizaine (Figure 38). Alors que la formation de la base de Schiff et du produit d'Amadori est réversible, la formation d'un AGE est irréversible (Jud et Sourij 2019; Sell et Monnier 2012). La

présence d'AGEs est positivement corrélée avec l'âge et le diabète, la concentration d'AGEs est également corrélée à des concentrations élevées d'EDP glyqués dans le sérum de patients diabétiques souffrant d'hypertension artérielle (Konova et al. 2004; Nikolov et al. 2014; Sell et Monnier 2012).



**Figure 38 - Schéma de la réaction de Maillard résumant les principales voies de glycation connues impliquées dans la rigidité artérielle. CEL = Carboxyéthyl-lysine ; CML = carboxyméthyl-lysine ; DOGDIC = réticulation imidazolium dérivée de la 3-désoxyglucosone ; DOLD = dimère de 3-désoxyglucosone-lysine ; G = glyoxal ; GALA = acide glycolique-lysine-amide ; GODIC = réticulation imidazolium dérivée du glyoxal ; GOLA = glyoxal-lysine-amide ; GOLD = dimère glyoxal-lysine ; MG = méthylglyoxal ; MOLD = dimère méthylglyoxal-lysine ; MODIC = réticulation imidazolium dérivée du méthylglyoxal. (Sell et Monnier 2012)**

Il existe plusieurs mécanismes par lesquels les AGE affectent la structure et la fonction du système cardiovasculaire. Le plus évident et le plus étudié est celui lié à la formation des pontages moléculaires dans les protéines de la MEC, particulièrement du collagène et de façon moins importante l'élastine, ce qui conduit à une augmentation de la rigidité vasculaire et myocardique (Susic, 2007; Zieman et Kass, 2004). Les AGE déclenchent également l'activation des voies de signalisation du stress et de l'inflammation via une liaison avec certains récepteurs, en particulier via le récepteur RAGE (Receptor for Advanced Glycation End-products) situé sur les CE, les CMLVs et les macrophages. On assiste alors, par exemple, à l'augmentation de l'expression du facteur NF- $\kappa$ B, de p12 (ras), de cytokines pro-inflammatoires, de molécules d'adhésion vasculaire ou encore de facteurs de croissance. Ces médiateurs sont susceptibles de stimuler les MMP et donc de renforcer l'accroissement de la rigidité artérielle *via* la dégradation de l'élastine. Ils contribuent également au mécanisme de dysfonction endothéliale puisque ces dernières sont alors à la fois exposées aux AGE circulants mais également aux AGE accumulés dans le sous endothélium par la liaison AGE-RAGE (Sell et Monnier 2012; Bakris et al. 2004; K. M. Choi et al. 2009; Greenwald 2007).

### **3.1.1.5 Radicaux libres, stress oxydatif et dysfonction endothélial**

A l'instar du glucose, les molécules d'oxygène jouent un rôle double dans l'organisme humain : un rôle bénéfique et vital en participant à la respiration cellulaire mais également un rôle délétère en provoquant les processus d'oxydation et de destruction de molécules biologiquement actives (Fhayli, Boëté et al. 2019). C'est la formation de radicaux libres appelés espèces réactives de l'oxygène (ROS) particulièrement l'ion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène produits *via* les chaînes respiratoires des mitochondries, le découplage de l'oxyde nitrique synthase (NOS) et les NADPH oxydase qui entraînent des lésions macromoléculaires par la production de peroxynitrite. Les ROS vont pouvoir interagir avec différentes molécules de l'organisme, notamment les lipides (particulièrement les lipides membranaires), les protéines et les acides nucléiques, ce qui peut entraîner des dégâts cellulaires majeurs, voire conduire à la mort de la cellule (El Assar, Angulo, et Rodríguez-Mañas 2013; Guzik et Touyz 2017)

Pour se protéger des ROS, l'organisme dispose de plusieurs systèmes : des enzymes antioxydantes comme les superoxydes dismutases, les catalases, l'hèmeoxygénase, la glutathion peroxydase ou encore l'utilisation de vitamines antioxydantes (A, E et C). Cependant, au cours du vieillissement, un déséquilibre se crée en faveur d'une augmentation de la concentration de ROS. D'une part, les processus de respiration cellulaire au sein de la mitochondrie vont perdre en efficacité ce qui va augmenter la production de ROS, d'autre part, les systèmes de protections perdent en efficacité conduisant à un état de stress oxydatif délétère. Si l'impact de l'augmentation de la production de ROS dans l'établissement du stress oxydatif fait consensus, les résultats obtenus à partir d'études dans lesquelles les niveaux de défense antioxydantes ont été déterminés sont parfois discutés (Guzik et Touyz 2017; El Assar, Angulo, et Rodríguez-Mañas 2013).

Au niveau vasculaire, outre leur capacité d'oxyder directement les fibres élastiques et particulièrement l'élastine (Umeda, Nakamura, et Suyama 2001), les ROS agissent de différentes façons : ils contribuent à la dysfonction endothéliale liée à l'âge (à l'instar des AGE (chapitre 3.1.1.3)). En effet, le vieillissement s'accompagne d'une altération des propriétés vasomotrices de la paroi vasculaire. Ainsi une diminution de la réponse contractile à la noradrénaline est constatée chez le sujet âgé accompagnée d'une augmentation de la perméabilité et une altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium déclenchée par l'acétylcholine (Vila et al. 1997). Cette dysfonction endothéliale passe notamment par l'induction d'une sénescence endothéliale via l'inhibition de la télomérase, de plus, l'interférence des ROS sur le système de signalisation du NO influence le vieillissement endothélial en altérant l'effet bénéfique du NO sur la sénescence des cellules endothéliales (Erusalimsky 2009; T. Hayashi et al. 2006). Les ROS provoquent également une altération de l'homéostasie des fibres élastiques, en effet, la présence de ROS induit la transcription de TE mais active également les MMP (Wlaschek et al. 2001). De plus, les ROS augmentent la sensibilité des fibres élastiques aux élastases (Cantor et al. 2006).

Cette dysfonction endothéliale participe également à la rigidification artérielle et au maintien de l'inflammation chronique de bas bruit au cours du vieillissement. En effet, la modification de la production du NO peut, par accroissement du stress oxydant endothélial, participer à l'acquisition par l'endothélium d'un phénotype pro-inflammatoire (pro-athérosclérotique). Les CE vont alors exprimer des récepteurs

médiateurs de l'inflammation qui sont des Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) et Inter Cellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), des molécules d'adhésion facilitant le recrutement monocytaire (VCAM-1 et d'ICAM-1 (circulants), et les Monocyte Colony Stimulating Factors (M-CSF) et la Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1). Ces médiateurs de l'inflammation vont participer à la désorganisation pariétale, et les CE vont sécréter, au même titre que les autres types cellulaires de la paroi artérielle, des cytokines et chimiokines pro- inflammatoires, (IL1, IL6, IL11 et les TNF $\alpha$  et  $\beta$ ) (Packard et Libby 2008; Giannotti et Landmesser 2007).

#### **3.1.1.6 Découplage du complexe récepteur de l'élastine (ERC)**

Bien que l'élastine soit capable de se lier à différentes molécules (voir chapitre 2.3), le complexe récepteur de l'élastine (ERC), tri-unitaire, est le récepteur de l'élastine le plus documenté et probablement le transducteur de signalisation des EDP le plus important au regard des connaissances actuelles. En effet, l'une des trois sous-unités de l'ERC, la protéine de liaison à l'élastine (EBP), déclenche la plupart des effets biologiques suivant l'interaction des EDP avec l'ERC (Duca et al. 2016).

Il a été démontré que le nombre de récepteurs à l'élastine ne décroît pas avec l'âge, cependant un découplage progressif de l'ERC, dépendant de l'âge, se produit, altérant ses voies de transduction sans que le mécanisme mis en cause ne soit pleinement décrit (Varga et al. 1997). Ce mécanisme conduit en particulier à la disparation avec l'âge de l'effet vasodilatateur des EDP sur les artères (G. Faury et al. 1997). Des études ont montré que le découplage de l'ERC observé au cours du vieillissement implique une augmentation de l'activité basale de Neu-1. La liaison des EDPs à l'EBP déclenche l'activation de Neu-1, ce qui entraîne la conversion du ganglioside GM3 en LacCer (lactosylcéramide), qui se comporte comme un messenger secondaire et transmet le signal de l'EDP (Rusciani et al. 2010; Duca et al. 2007). Cette étude montre qu'il existe une augmentation basale de l'activité de Neu-1 lié à l'âge, pour autant, l'activité sialidase de Neu-1 est réduite en réponse aux EDP, en effet, la production de lactosylcéramide médiée par les EDP est réduite dans les cellules vieillissantes. Les auteurs émettent l'hypothèse que la modification de l'activité basale de Neu-1 liée à l'âge pourrait être responsable de l'altération de la signalisation des EDPs observée au cours du vieillissement (Duca et al. 2016; Scandolera et al. 2015).

Malgré le découplage, le récepteur conserve partiellement son activité de signalisation induite par les peptides d'élastine, essentiellement ceux liés à la production d'élastase et de radicaux libres (Fulop et coll., 2001). Il y a donc une modification d'activité de l'ERC au cours du vieillissement avec une majoration des effets potentiellement délétères, au détriment d'effets bénéfiques, tels que l'action vasorelaxante des peptides d'élastine.

#### **3.1.1.7 Raccourcissement des télomères**

Les télomères sont des régions d'ADN de longueur variable situées à l'extrémité de tous les chromosomes. Chez l'homme, ils sont composés de nombreuses répétitions de six nucléotides : TTAGGG. Les télomères sont organisés en une structure tridimensionnelle complexe, qui est essentielle à leur propriété protectrice. Chez l'Homme, la longueur moyenne des télomères leucocytaires (LTL) à la naissance est de 11 kilo paires de bases (kbp) et diminue jusqu'à moins de 4 kbp chez les personnes

âgées (Herrmann et al. 2018). Cependant, le raccourcissement des télomères n'est pas un processus linéaire, où un nombre constant de paires de bases est perdu à chaque division cellulaire. L'activité de la télomérase et les événements de raccourcissement des télomères peuvent moduler la longueur des télomères dans les deux sens (Gruber et al. 2021). En effet, la télomérase est un complexe ribonucléoprotéique capable d'allonger les télomères par la synthèse *de-novo* de l'ADN télomérique et de contrer ainsi le problème de la réplication terminale (Yaqiang Wang, Sušac, et Feigon 2019). Il se compose d'un élément protéique, la transcriptase inverse de la télomérase (TERT), qui abrite l'activité enzymatique, et d'un élément ARN de la télomérase (TERC), également appelé ARN de la télomérase humaine (hTR). Le TERC sert de modèle pour l'élongation des télomères. Au début du développement embryonnaire, la télomérase est active et assure un allongement approprié des télomères. Cependant, l'enzyme devient inactive après 18 semaines de gestation (Gruber et al. 2021). Ainsi, le vieillissement est caractérisé par un raccourcissement progressif des télomères dû à la division cellulaire et l'érosion des télomères. En raison du raccourcissement progressif des télomères dû au vieillissement, ils sont souvent considérés comme une "horloge moléculaire du vieillissement" (Gruber et al. 2021).

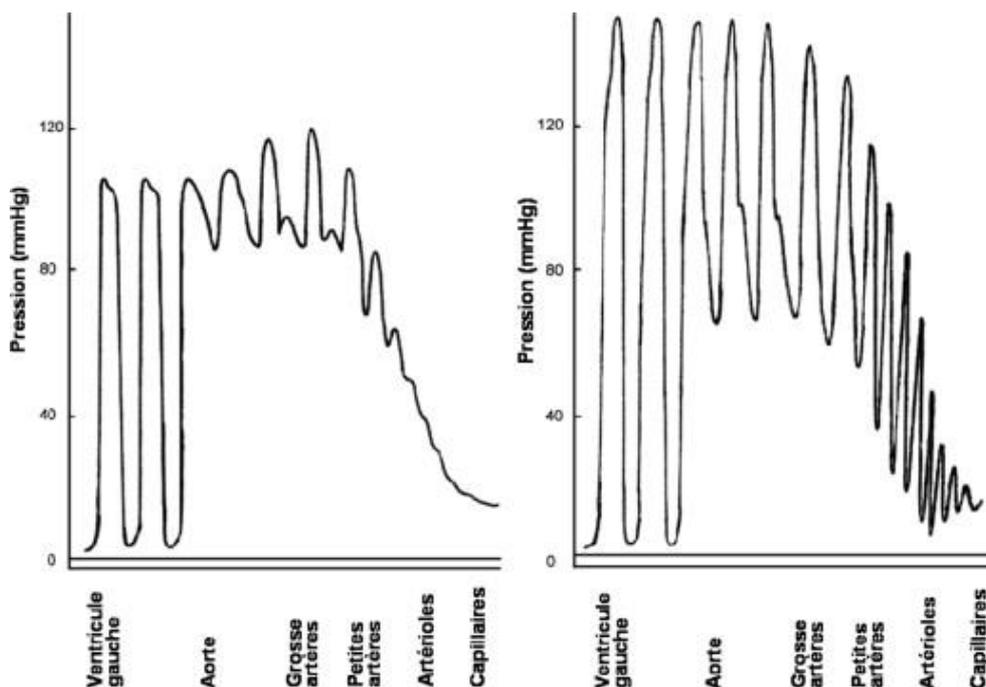
Certaines études ont établi une corrélation entre le raccourcissement des télomères et un risque accru de maladies cardiovasculaires comme des maladies coronariennes ou des infarctus du myocarde indépendamment d'autres facteurs de risques classiques de maladies cardiovasculaires ((Haycock et al. 2014; Hoffmann et al. 2021; Brouillette et al. 2003). Une autre étude a établi que la longueur des télomères de patients atteints de cardiopathies coronaires était significativement plus courte que ceux du groupe contrôle. De plus, cette étude montre que le raccourcissement des télomères est un corrélé à une augmentation de la rigidité artérielle, suggérant ainsi que la longueur des télomères pourrait être un biomarqueur de l'élasticité artérielle et de la survenue de maladies cardiovasculaires (Y.-Y. Wang et al. 2011).

#### **3.1.1.8 Carbamylation**

Plus récemment, il a été démontré que l'élastine est également sujette à la carbamylation, une autre réaction non-enzymatique, à l'instar de la formation des AGE, impliquant la liaison de l'acide isocyanique aux groupes amines libres. L'acide isocyanique est principalement formé par la dissociation spontanée de l'urée mais peut également être dérivé du thiocyanate par la myéloperoxydase. L'acide isocyanique réagit alors avec les groupes  $\epsilon$ -amino des chaînes latérales de la lysine conduisant à la formation d'homocitrulline (HCit), le produit dérivé de la carbamylation le plus caractéristique (Gorisse et al. 2016). Différentes études ont démontré une relation entre la carbamylation de certaines protéines, notamment le collagène, et la survenue de maladies cardiovasculaire tels que des maladies coronariennes, des infarctus du myocarde ou des accident vasculaires cérébral (Jaisson et al. 2015; Z. Wang et al. 2007). Le rôle des produits dérivés de la carbamylation a également été démontré dans le processus d'athérosclérose (Apostolov et al. 2010; Basnakian et al. 2010). Une étude récente a pu déterminer que le processus de carbamylation des fibres élastiques est associé à une augmentation de la rigidité des fibres élastiques aussi bien que de la paroi artérielle, le mécanisme moléculaire et structural en cause au sein des fibres élastiques restant toutefois inconnu à ce jour (Doué et al. 2021).

### 3.1.2 Conséquences fonctionnelles du vieillissement vasculaire : l'artériosclérose

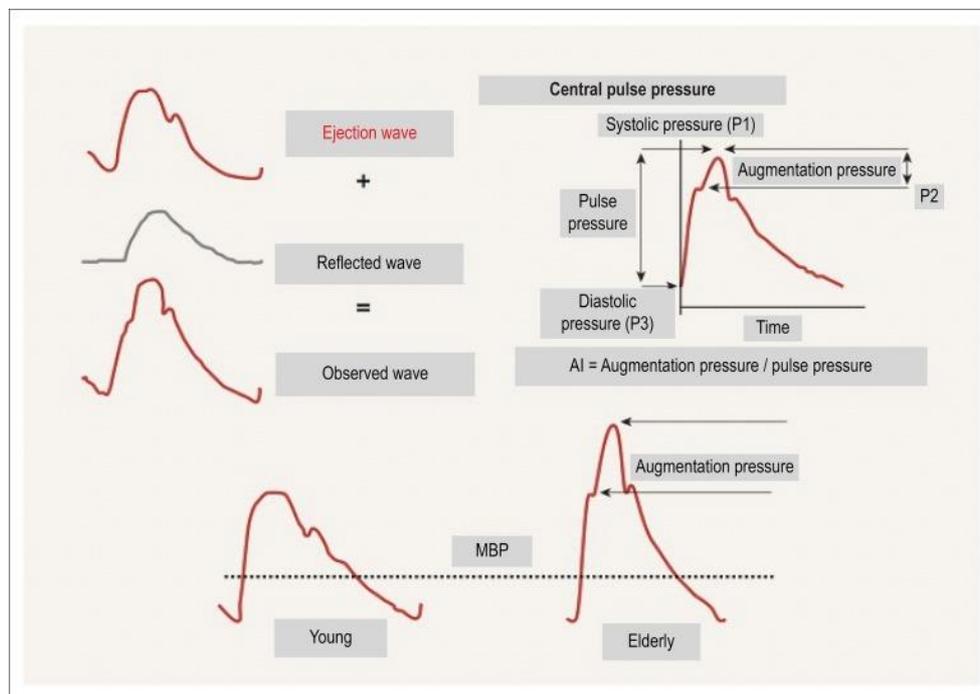
L'ensemble des processus évoqués précédemment entraîne ce que l'on appelle l'artériosclérose. Sa composante majeure est la rigidification artérielle, elle est multifactorielle et liée à un remodelage qualitatif (de la composition) et à un épaississement de la paroi vasculaire, conduisant à une diminution de l'élasticité et de la compliance vasculaire. Ainsi, le réseau artériel perd sa fonction de lissage de la pression sanguine et du flux sanguin, ce qui va avoir un impact négatif sur la microcirculation puis sur les organes en particulier les reins et le cerveau (Figure 39) (O'Rourke et Safar, 2005 ; Mitchell et al., 2004). En effet, l'augmentation de la pression pulsée (PP qui correspond à la différence entre les pressions artérielles systolique et diastolique) au niveau périphérique est en grande partie compensé au niveau systémique car leur débit microcirculatoire est déterminé par la pression moyenne et par ce que les cellules vasculaires de nombreux organes sont protégées par les artères et artérioles en partie contractées en amont. Les cellules des vaisseaux de la microcirculation du cerveau et des reins ne bénéficient pas d'une telle protection car les vaisseaux artériels en amont restent dilatés. Ces cellules sont donc soumises à une contrainte circonférentielle pulsatile et à une contrainte de cisaillement longitudinale plus élevées qui seront délétères au long court (O'Rourke et Safar 2005)



*Figure 39 - Changement de pression pulsatile dans l'arbre vasculaire. Représentation schématique de la pression pulsatile depuis le ventricule gauche jusqu'aux capillaires chez le sujet jeune (à gauche) et chez le sujet plus âgé (à droite) présentant une rigidité artérielle. Chez le sujet âgé, les pulsations de la pression du sang éjecté par le cœur sont moins absorbées dans les grosses artères et donc sont présentes jusqu'au niveau de la microcirculation, avec une pression systolique plus haute et une pression diastolique plus basse dans les artères. La rigidification artérielle liée à l'âge augmente également la post-charge, ce qui augmente le travail du cœur et peut conduire à une hypertrophie cardiaque (Cottart et al. 2009), d'après (O'Rourke et Hashimoto 2007)).*

L'artériosclérose provoque d'autres altérations, liées cette fois à la modification de la transmission de l'onde de pouls. À chaque battement de cœur, une onde de pouls est générée et se déplace du cœur vers la périphérie le long de l'arborescence vasculaire jusqu'à ce qu'elle rencontre une résistance périphérique ou un point de bifurcation, générant une nouvelle onde réfléchie en direction cette fois du cœur. La vitesse de cette onde réfléchie et la phase du cycle cardiaque au cours de laquelle elle se produit (systole ou diastole) dépendent de la résistance vasculaire périphérique, de l'élasticité, principalement des grosses artères, et de la tension artérielle centrale, et sont liées aux principaux risques cardiovasculaires (Mikael et al. 2017).

Chez les individus jeunes, les artères sont plus élastiques. Ainsi, l'onde réfléchie retourne au cœur au moment de la diastole, ce qui augmente la pression diastolique et améliore la perfusion coronaire. En outre, la réflexion de l'onde renvoie une partie de l'énergie pulsatile vers l'aorte, où elle est dissipée, ce qui limite la transmission de l'énergie pulsatile vers la périphérie et prévient les dommages de la microcirculation. (Safar, Levy, et Struijker-Boudier 2003) Avec le vieillissement vasculaire, la vitesse de l'onde de pouls (VOP) augmente, ce qui entraîne une réflexion précoce de cette onde, qui atteint le cœur pendant la systole. Ainsi, l'onde de réflexion se superpose à l'onde incidente provoquant une augmentation de la pression artérielle systolique (PAS), et un renforcement de la diminution de la pression artérielle diastolique (PAD), avec pour conséquence une augmentation de la charge de travail cardiaque lié à l'augmentation de la post-charge et une réduction de la perfusion coronaire (Figure 40) (Mikael et al. 2017; Safar, Levy, et Struijker-Boudier 2003). L'hypertension artériosclérotique se distingue donc par sa propension à augmenter la pression pulsée (PP = PAS – PAD) de par ses effets opposés sur la PAS et la PAD contrairement à de nombreux autres mécanismes d'hypertension (voir chapitre 3.2.1).



**Figure 40 – Altération de la fonction artérielle au cours du vieillissement. MBP : Mean blood pressure (Mikael et al. 2017)**

Ainsi, les troubles de l'amortissement de la pression sanguine par rigidification de la paroi artérielle liée à l'artériosclérose vont plutôt avoir des répercussions en amont c'est-à-dire sur la fonction cardiaque, bien qu'ayant des conséquences sur la microcirculation notamment du rein et du cerveau (Mikael et al. 2017). Le travail que doit fournir le cœur pour éjecter le même volume de sang dans la circulation artérielle augmente fortement du fait de l'augmentation de la post-charge. Cela se traduit par une augmentation des besoins du myocarde en oxygène et en nutriments, difficilement assurée du fait de la diminution de la PAD et de la baisse induite de la perfusion coronaire. A terme, l'augmentation du travail cardiaque aboutit à une hypertrophie du ventricule gauche. Le cœur hypertrophié se contracte (et se relâche) alors plus lentement, de sorte que la durée de la systole est augmentée alors que celle de la diastole est réduite pour une fréquence cardiaque donnée. L'hypertrophie ventriculaire est d'ailleurs, en soi, un facteur indépendant de morbidité et mortalité cardiovasculaire chez les personnes âgées (Brieler, Breeden, et Tucker 2017). La combinaison d'un besoin sanguin/énergétique accru et d'une capacité de perfusion coronaire réduite, du fait de la diminution de la pression diastolique et du temps passé en diastole, prédispose à l'ischémie myocardique et par conséquent à l'insuffisance cardiaque même en présence d'une vascularisation coronaire saine (Figure 41) (O'Rourke et Hashimoto 2007).

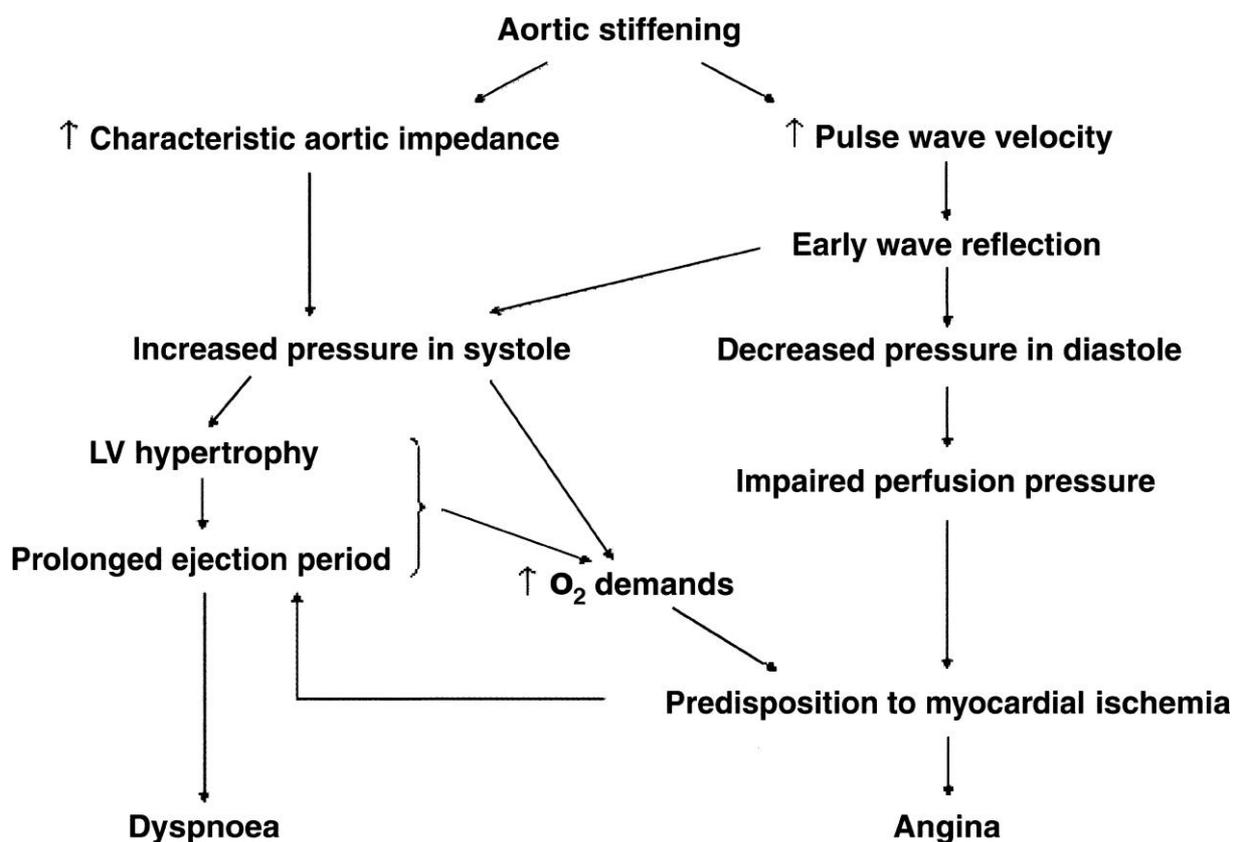


Figure 41 – Effet de la rigidité artérielle sur le cœur. (O'Rourke et Hashimoto 2007)

L'artériosclérose est ainsi un processus qui s'autoalimente puisque l'augmentation de la PAS augmente les contraintes exercées sur la paroi artérielle, augmentant le processus de fatigue et de dégradation des fibres élastiques, et donc favorise

l'augmentation de la rigidité artérielle. De même, qu'au niveau cardiaque, le déséquilibre entre l'éjection ventriculaire et la transmission de l'onde aortique pulsée renforce le risque d'insuffisance cardiaque.

## **3.2 Le vieillissement pathologique du système vasculaire**

L'artériosclérose, l'altération de la régulation du tonus vasculaire, l'accumulation de ruptures moléculaires au sein des fibres élastiques et la libération d'EDPs qui en découle ainsi que les manifestations du découplage du complexe récepteur de l'élastine vont progressivement altérer la fonction de la paroi artérielle et la rendre plus susceptible au développement de pathologies de l'arbre vasculaire. A ces facteurs de risques intrinsèques, il faut ajouter divers facteurs de risque externes, liés aux conditions et habitudes de vie, tels que le régime alimentaire, le stress, le tabagisme, le contact avec des agents infectieux ou encore la sédentarité. Ainsi, l'ensemble de ces facteurs sont susceptibles de favoriser le déclin de la fonction vasculaire et l'apparition de maladies cardiovasculaires, qui sont reconnues comme la première cause mortalité au niveau mondial et européen particulièrement dans les pays industrialisés (Townsend et al. 2022; GBD 2017 Causes of Death Collaborators 2018).

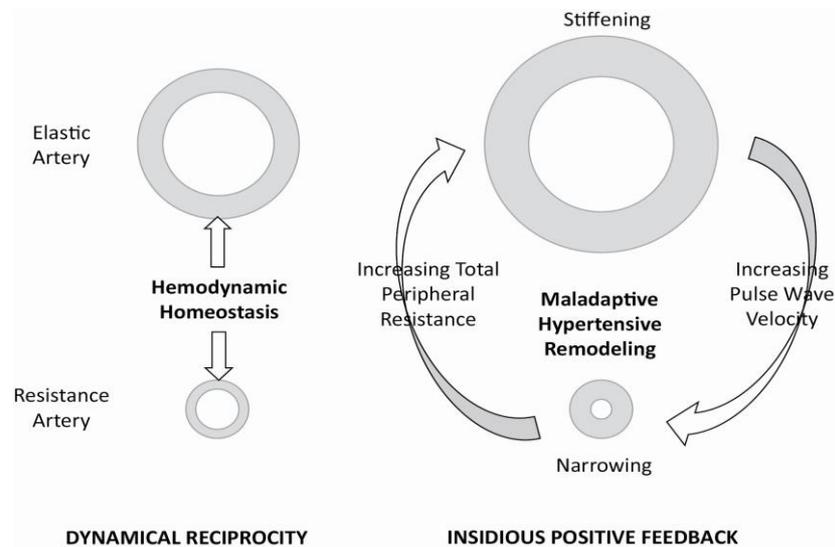
### **3.2.1 L'hypertension artérielle**

De nombreuses études ont montré que l'hypertension artérielle systémique est un des facteurs de risque les plus importants de dommages fonctionnels et structurels de la paroi artérielle, entraînant une rigidification artérielle précoce, et favorisant l'apparition de maladies cardiovasculaires tels que l'insuffisance cardiaque, les accidents vasculaires cérébraux (AVC) ou les infarctus du myocarde (Fhayli, Boëté et al. 2019; Safar 2018). Sa prévalence augmente inévitablement au niveau mondial en raison du vieillissement de la population et de la proportion croissante de l'obésité, et on estime que l'hypertension artérielle touchera un tiers de la population mondiale d'ici 2025 (GBD 2017 Risk Factor Collaborators 2018).

L'hypertension artérielle systémique est caractérisée par une élévation chronique de la pression sanguine au-delà d'une pression systolique de 140 mmHg et diastolique de 90 mmHg. Il s'agit d'une pathologie complexe et plurifactorielle. L'élévation de la pression artérielle est souvent associée à deux caractéristiques que sont l'augmentation des résistances périphériques et l'augmentation de la rigidité artérielle. La rigidité artérielle, médiée par l'altération de la compliance artérielle peut être mesurée par la vitesse de l'onde de pouls, qui augmente avec la rigidification de la paroi artérielle. La rigidité artérielle est corrélée à l'hypertension artérielle et en est même un facteur causal (Z. Sun 2015). L'hypertension peut être liée à une augmentation des résistances périphériques (généralement provoquée par un rétrécissement des artères de résistance), elle peut être la conséquence de certaines pathologies comme le diabète ou une dysfonction rénale entraînant une rétention de sodium induisant une augmentation du volume sanguin ou encore une altération du système rénine/angiotensine/aldostérone.

Il existe une boucle de rétroaction positive entre l'hypertension et la rigidité artérielle. En effet, l'augmentation de la rigidité artérielle va entraîner une augmentation de la pression artérielle qui va entretenir et favoriser les processus de remodelage vasculaire, la dysfonction endothéliale, la libération de ROS, si bien que pour certains

patients il est très difficile de connaître le point de départ de cette dysfonction (Figure 42) (Humphrey 2021).



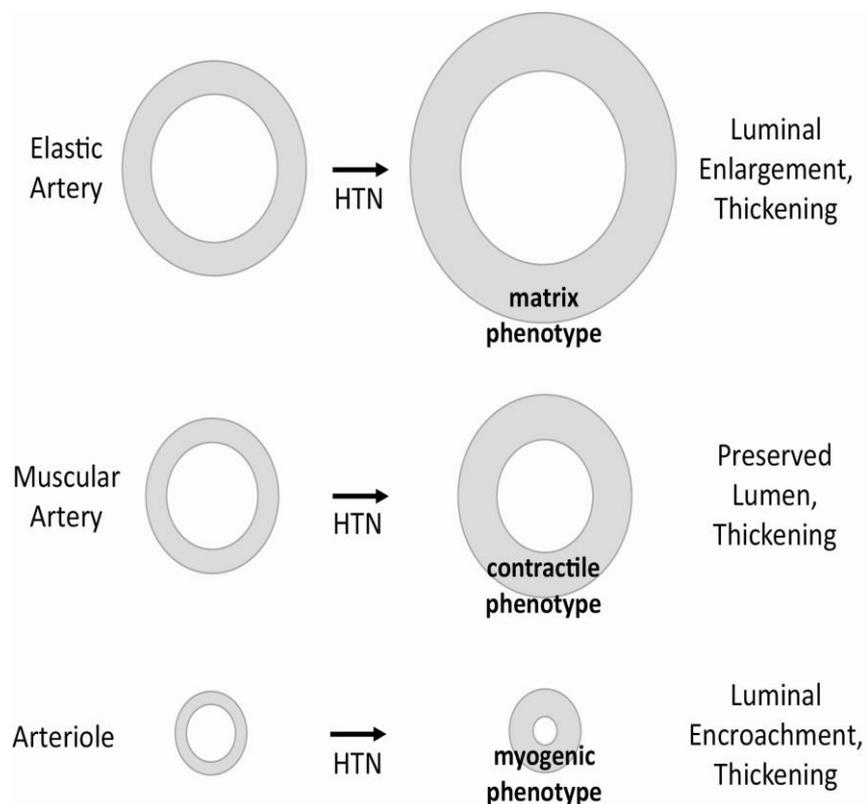
**Figure 42 – Mécanisme du remodelage vasculaire dans l’hypertension artérielle.** (Humphrey 2021)

La paroi artérielle tend à préserver une homéostasie mécanique face aux changements de pression au sein de l’arbre vasculaire. Cependant, lors d’une hypertension artérielle chronique, les mécanismes compensatoires, bénéfiques à court terme vont provoquer un remodelage vasculaire qui finira par être délétère pour l’organisme à long terme.

Afin de lutter contre l’augmentation de la contrainte, la paroi artérielle va subir un remodelage important notamment par un épaississement de la paroi médié par les CMLVs pour tenter de répondre à l’augmentation de la pression. Cependant, ce remodelage va avoir des répercussions différentes entre les artères de grande taille (artères élastiques de conduction), les artères moyennes (artères musculaires) et les artères de petite taille (artérioles) :

- Les grosses artères ont tendance à se remodeler vers l’extérieur, cela s’explique par le fait que les CMLVs des grosses artères présentent un phénotype matriciel important responsable de la mécanosensibilité et de la mécanorégulation de la matrice de la paroi pour assurer une élasticité adéquate mais une contractilité modérée afin de ne pas empêcher la distension élastique induite par la pression. Ainsi, le remodelage de la paroi n’est pas contraint et induit une dilatation de ces artères (Kelleher, McLean, et Mecham 2004; Humphrey 2021).
- Les artères musculaires et les artérioles ont tendance à se remodeler vers l’intérieur, en empiétant sur la lumière. Cela s’explique par l’augmentation progressive du phénotype contractile des CMLVs dans le reste de l’arbre vasculaire afin de permettre une mécanorégulation de plus en plus fine qui va provoquer le renouvellement de la matrice au détriment de la lumière des vaisseaux (Martinez-Lemus, Hill, et Meininger 2009).

Il est intéressant de noter que la dilatation des artères élastiques n'est pas très intense, mais qu'elle peut tout de même contribuer à réduire l'augmentation de la vitesse de l'onde de pouls qui résulte de la rigidification structurelle de la paroi artérielle. De même, le rétrécissement de la lumière dans les artérioles n'est pas idéal, mais il peut contribuer initialement à atténuer la pénétration des ondes de pression du pouls dans la microcirculation (Figure 43) (Humphrey 2021). Ces réponses, initialement bénéfiques pour permettre l'homéostasie mécanique artérielle, finissent par devenir délétères avec le temps et la chronicité des contraintes. Ceci est particulièrement important au niveau des grosses artères élastiques qui finissent par se fibroser, entraînant une réduction importante de la compliance et favorisant la boucle de rétroaction positive pour laquelle l'inflammation chronique de bas bruit joue également un rôle majeur. En effet, l'hypertension est également associée à la surexpression de cytokines, de molécules pro-inflammatoires (NF- $\kappa$ B, Il-6, MCP-1, MCSF), et protéines d'adhérence (ICAM-1, VCAM-1) aboutissant au recrutement de monocytes/macrophages dans la paroi artérielle (M. Wang et al. 2014).



**Figure 43 - Schéma des réponses différentielles des grandes (élastiques), moyennes (musculaires) et petites (artérioles) artères à une augmentation soutenue de la pression sanguine (HTN = hypertension). (Humphrey 2021)**

Comme cela a été présenté précédemment, les mécanismes dégradatifs liés au vieillissement, tels que la fatigue mécanique, la calcification et l'exposition aux produits de glycation/carbamylation, favorisent de manière générale la susceptibilité de l'élastine et des fibres élastiques à la dégradation par les élastases (protéinases à sérine ou à cystéine, et MMP) (Wassim Fhayli et al. 2019a; Duca et al. 2016). Cependant, les fibres élastiques sont sujettes à une fragmentation encore accrue dans l'hypertension. Ainsi, des quantités réduites d'élastine ont été observées chez des rats

hypertensifs spontanés (SHR-SP) sujets aux accidents vasculaires cérébraux (Ito, Kwan, et Daniel 1987). Paradoxalement, en apparence seulement, une production accrue de tropoélastine en réponse à un stress mécanique a été observée au stade très précoce de l'hypertension chez des rats Dahl sensibles au sel, à l'acétate de déoxycorticostérone (DOCA) (F. W. Keeley et Johnson 1986). Cependant, la tropoélastine nouvellement synthétisée ne peut pas être assemblée en fibres élastiques matures et ne parvient pas à rétablir l'élasticité (Cai et al. 2021). Les mécanismes de compensation des effets délétères de l'hypertension sur l'élastine s'avèrent donc incomplets et sont peu efficaces. Afin de prévenir les maladies cardiovasculaires, y compris celles en relation avec la dégradation des fibres élastiques, la lutte contre l'hypertension artérielle doit donc être une priorité à tout âge. L'une des stratégies envisageable est de cibler le remodelage de la MEC, particulièrement de l'élastine en réparant les fibres existantes et/ou en favorisant la néo-synthèse de fibres élastiques fonctionnelles (Cocciolone et al. 2018; Pierce 2017).

### 3.2.2 L'athérosclérose

Si l'artériosclérose est une conséquence de modifications généralisées sur l'ensemble du système artériel de tous les individus, l'athérosclérose, avec qui elle partage de nombreux mécanismes causals, se définit par des modifications pathologiques focales (des plaques d'athérome) en certains points de l'arbre vasculaire chez une partie de la population (Cottart et al. 2009).

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique d'évolution lente touchant focalement les artères de gros et de moyen calibres. Elle se caractérise par un remaniement de l'intima consistant en une accumulation de lipides, glucides complexes, de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôts calciques. La formation des plaques commence par la diffusion et l'accumulation de cholestérol LDL circulant dans la paroi artérielle, en raison d'un dysfonctionnement endothélial, leur localisation préférentielle est située au niveau des ramifications, bifurcations et courbures de l'arbre vasculaire, où l'écoulement laminaire du flux sanguin est perturbé (diminution des forces de cisaillement et augmentation des turbulences) (Fhayli, Boëté et al. 2019). Les lipides ainsi accumulés vont être oxydés ce qui stimule l'inflammation vasculaire et le recrutement de monocytes dans la paroi vasculaire. Progressivement, va s'installer au sein de la paroi artérielle ce que l'on appelle une plaque d'athérome. Outre le risque d'ischémie lié à l'obstruction de la lumière par la progression de la plaque et la perturbation du flux sanguin liée à cette dernière, le risque majeur est la rupture de cette plaque d'athérome. En effet, la chape fibreuse de la plaque est progressivement fragilisée par les MMP, la diminution du collagène synthétisé ainsi que la forte activité apoptotique régnant au sein de la lésion. L'exposition du cœur de la plaque à la circulation sanguine déclenche la formation d'un thrombus plaquettaire susceptible de provoquer un accident de type embolique (infarctus du myocarde, embolie pulmonaire ou accident vasculaire cérébrale en fonction de la localisation de la plaque et du thrombus) (Fhayli, Boëté et al. 2019; Jacob 2006).

Certaines modifications majeures tels que l'inflammation, le stress oxydatif, la dysfonction endothéliale, la formation de ponts de collagène, la désorganisation des fibres élastiques et la diminution du rapport élastine/collagène sont des facteurs favorisant l'athérosclérose. La modification du ratio élastine/collagène et la rigidification intimale induisent une rupture de l'intégrité de la barrière endothéliale et augmente la perméabilité de cette dernière, favorisant la transmigration des molécules

inflammatoires, des monocytes et des lipides, entraînant le développement des lésions athérosclérotiques (Huynh et al. 2011).

De plus, différentes études ont montré que la TE et les EDP jouent également un rôle dans la formation de la plaque d'athérome (Duca et al. 2016):

- Les EDP modulent le niveau de calcium intracellulaire et la libération de NO dans les cellules endothéliales, favorisent l'oxydation des LDL et le recrutement des monocytes et des leucocytes par un effet chimioattractif, et modulent la différenciation des lymphocytes présents dans les plaques (Fhayli, Boëté et al. 2019; Wahart et al. 2019; Maurice et al. 2013; Fulop et al. 2005)
- La tropoélastine est réexprimée et s'accumule de manière désordonnée dans les plaques d'athérome, et elle a récemment été proposée comme un biomarqueur de la progression et de l'instabilité des plaques d'athérome (Phinikaridou et al. 2018)
- En croisant des souris génétiquement déficientes en MMP (MMP-2, -7, -9, -12) ou en cathepsine (K, L, S) avec des souris *LDLR*<sup>-/-</sup> ou *ApoE*<sup>-/-</sup>, deux modèles établis d'athérogenèse, il a été démontré que la dégradation de l'élastine contribue à la progression de l'athérosclérose (Newby 2012; Lafarge et al. 2010). Des données contradictoires ont été rapportées sur la stabilité des plaques, mais la fragmentation de l'élastine pourrait bien jouer un rôle important dans la déstabilisation et la rupture des plaques, comme l'ont rapportées deux études d'un même groupe (Van der Donckt et al. 2015; Van Herck et al. 2009).

### 3.2.3 Les anévrismes vasculaires

La destruction des fibres élastiques joue également un rôle prédominant dans le développement des anévrismes de l'aorte abdominale (AAA), une affection vasculaire chronique dégénérative associée au vieillissement (Kent 2014). Un anévrisme est une dilatation permanente et localisée d'une artère présentant une augmentation de son diamètre d'au moins 50%. Les anévrismes touchent particulièrement les grosses artères élastiques et de façon plus fréquente l'aorte abdominale (AAA) par rapport à l'aorte thoracique (AAT) (Johnston et al. 1991). Des différences étiologiques existent entre ces deux types d'anévrismes avec une cause souvent génétique pour les AAT (syndrome de Marfan due à une déficience génétique de la fibrilline-1 ou du récepteur TGF- $\beta$ , Cutis Laxa, déficience génétique en *Lox*) alors que les AAA surviennent principalement à un âge avancé, et sont liées à la fois à des facteurs environnementaux (tabagisme, âge avancé, sexe masculin, maladies coronariennes, hyperlipidémie, hypertension et bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)) et à des facteurs génétiques familiaux différents des mutations génétiques rares (Fhayli, Boëté et al. 2019).

Un anévrisme n'est pas une simple dilatation passive. Il résulte plutôt d'un processus multifactoriel actif dont le développement est déclenché par un remodelage dynamique de la paroi. En effet, la physiopathologie des anévrismes aortiques est complexe et se caractérise par une infiltration de la paroi vasculaire par des lymphocytes et des macrophages, la destruction des fibres élastiques et du collagène dans la média et l'adventice, la perte de cellules musculaires lisses avec amincissement de la média, et la néovascularisation.

Différents modèles d'AAA ont été utilisés pour comprendre les mécanismes à l'œuvre. Par exemple, la perfusion d'élastase pancréatique porcine dans des aortes de rat, en

plus des modèles animaux bien connus d'angiotensine II et de chlorure de calcium, a été largement utilisée comme modèle d'AAA et a révélé que la destruction des fibres élastiques joue un rôle critique dans le développement de l'AAA. Ces effets néfastes sur le développement de l'AAA ont également été démontrés en utilisant des souris déficientes en MMP telles que MMP-2 et MMP-9, et plus récemment en utilisant des souris déficientes en cathepsine S, K, et L (Y. Qin et al. 2012; J. Sun et al. 2012; 2011). Chez ces souris déficientes en cathepsine, la réduction significative du développement de l'AAA est associée à une diminution de la fragmentation de l'élastine, de la prolifération cellulaire et de l'apoptose, de l'infiltration des cellules inflammatoires, de l'expression des protéases et de l'angiogenèse, dans des proportions différentes selon la déficience en cathepsine.

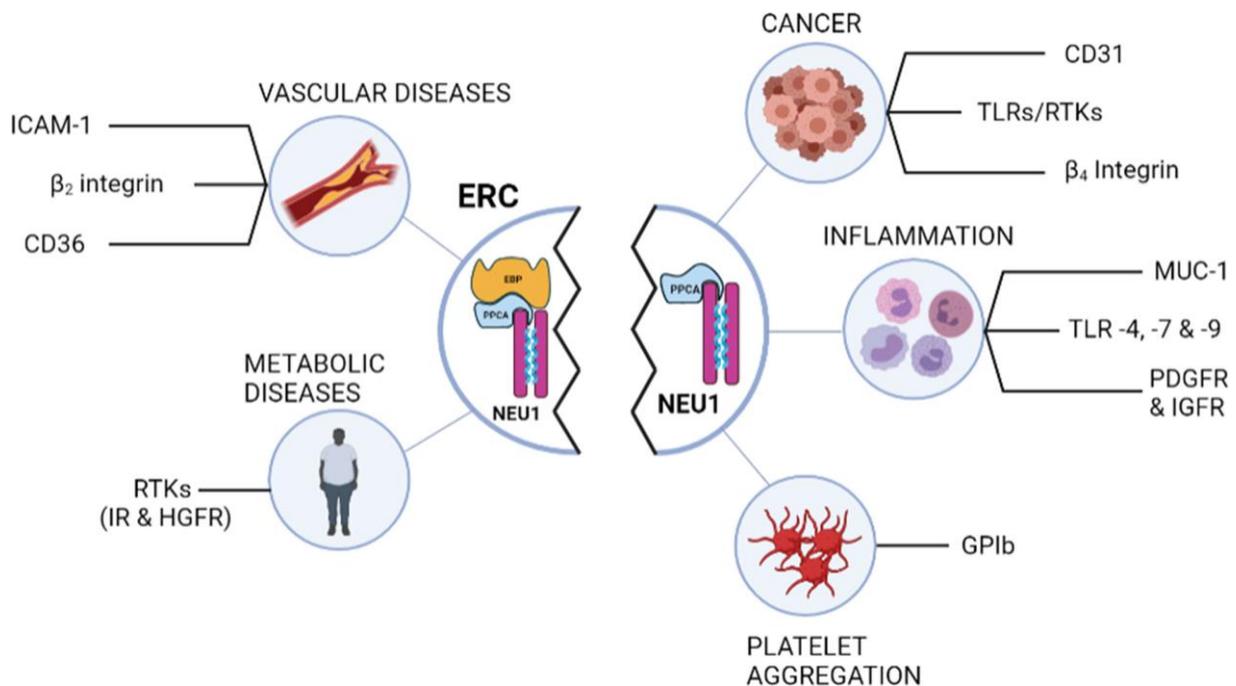
Chez l'humain, plusieurs études fondées sur des cohortes ont proposé que les EDP circulantes puissent être utilisées comme biomarqueur prédictif de la progression de l'AAA (Hellenthal et al. 2009). Les EDP peuvent être des signaux importants pour une variété de cellules impliquées dans le développement de l'AAA, en stimulant le chimiotactisme et la production de MMP. Des preuves directes de l'implication des EDP ont été fournies en utilisant le peptide VGVAPG et l'anticorps BA4 (un anticorps bloquant dirigé contre le domaine de l'EBP de reconnaissance de la séquence GxxPG).

### **3.2.4 Conséquences pathologiques des EDP**

Outre leurs effets sur l'athérosclérose et les anévrismes, les EDPs possèdent de nombreux effets entraînant des conséquences pathologiques (Figure 44) (Duca et al. 2016; Tembely et al. 2022) :

- Différentes études montrent une implication des EDP dans le développement du diabète de type 2, des taux sériques d'EDP et d'EBP glyqués ont été signalés chez les patients diabétiques, ainsi que des concentrations plasmatiques accrues de MMP (notamment MMP-2 et MMP-9) (Duca et al. 2016; Nikolov et al. 2014; Nicoloff et al. 2007). Une étude montre également que l'administration chronique d'EDPs chez la souris favorise la résistance à l'insuline par la modulation du récepteur de l'insuline via l'ERC et plus particulièrement la désialylation du récepteur de l'insuline par Neu-1 (Blaise et al. 2013).
- L'accumulation chronique d'EDPs chez la souris provoque une stéatohépatite non alcoolique par un mécanisme impliquant la désialylation du facteur de croissance hépatique (HGFR) (Romier et al. 2018).
- Des études sur la thrombose montrent également un impact des EDP, ces études montrent que les EDP diminuent l'agrégation plaquettaire humaine dans le sang total induite par différents agonistes plaquettaires. De plus, les EDPs réduisent fortement la formation de thrombus dans un modèle murin de thrombose induite par une blessure chimique. Le rôle régulateur des EDPs sur la thrombose est lié à la présence du complexe récepteur de l'élastine fonctionnel sur les plaquettes faisant intervenir la sialidase Neu-1 ainsi qu'à la capacité des EDPs à perturber l'interaction du facteur de von Willebrand plasmatique avec le collagène en se liant aux fibres de collagène (Kawecki et al. 2014).
- Différentes études montrent également le rôle des EDPs dans la progression de certains cancers comme des mélanomes, certains cancers du poumon ou

encore des carcinomes de la langue (Bretaudeau et al. 2020; Devy et al. 2010; Toupance et al. 2012).

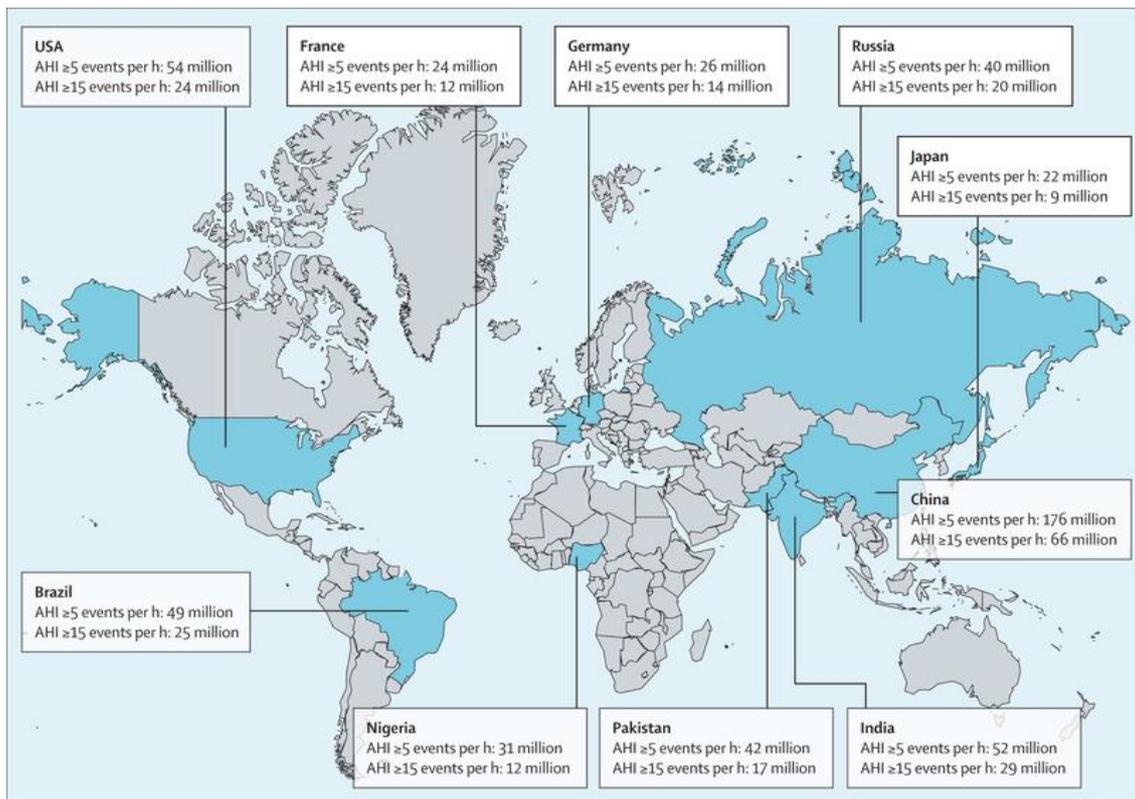


*Figure 44 - Représentation schématique des glycoprotéines membranaires régulées par la désialylation via NEU1 et pertinence biologique potentielle dans diverses maladies. Le panneau de gauche montre les glycoprotéines membranaires régulées par désialylation via NEU1 après implication de l'ERC. Le panneau de droite énumère les autres glycoprotéines membranaires dont il a été démontré qu'elles sont désialylées par NEU1. EBP, protéine de liaison à l'élastine ; ERC, complexe récepteur de l'élastine ; HGFR, récepteur du facteur de croissance hépatique ; ICAM-1, molécule d'adhésion intercellulaire-1 ; IR, récepteur de l'insuline ; MUC-1, mucine-1 ; NEU1, neuraminidase-1 ; PDGFR, récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes ; PPCA, protéine protectrice/cathepsine A ; IGFR, récepteur du facteur de croissance analogue à l'insuline ; RTK, récepteur tyrosine kinase ; TLR, Toll-like receptor. (Tembely et al. 2022)*

### 3.2.5 Les conséquences pathologiques du syndrome d'apnées obstructives du sommeil

Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) est caractérisé par des obstructions intermittentes et répétées des voies aériennes supérieures pendant le sommeil, induisant une apnée et une hypoxémie transitoire, déclenchant des épisodes de micro-réveil non perçus par le patient ayant des conséquences diurnes (fatigue et somnolence, généralement associés à une perte de productivité et à un risque d'accident accru) et nocturnes (micro réveils, ronflements) ainsi que différentes manifestations physiopathologiques. Le SAOS est une pathologie parfois difficile à identifier car il nécessite, pour être confirmé, une hospitalisation dans le but de réaliser une polysomnographie qui est l'examen de référence. Le SAOS est un trouble respiratoire très fréquent, particulièrement dans les pays industrialisés. En effet, une étude récente estime sa prévalence à près d'un milliard de personnes adultes bien que ce nombre ne soit qu'une estimation au vu de la difficulté à diagnostiquer cette pathologie car elle évolue parfois longuement de façon asymptomatique (Figure 45)

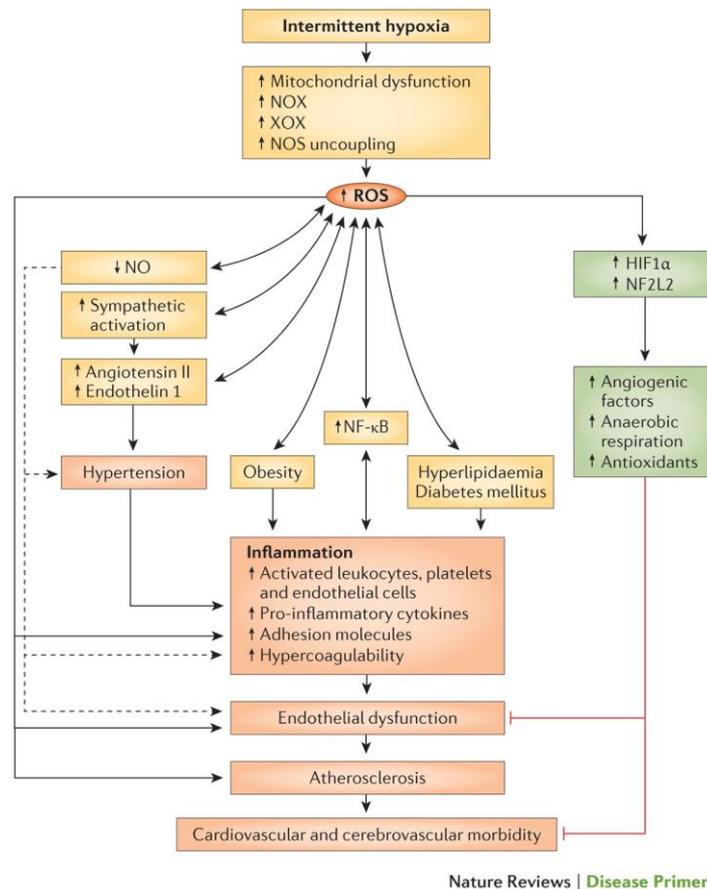
(Benjafield et al. 2019). Cette pathologie concerne donc plus de 10% de la population générale et sa prévalence augmente jusqu'à 30-50% des personnes âgées ce qui en fait un problème majeure de santé publique (Lévy et al. 2015; Durán et al. 2001). Le facteur de risque le plus important de survenue de SAOS est l'obésité mais d'autres facteurs de risque sont identifiés comme l'âge (> 65 ans), certaines anomalies craniofaciales, le mode de vie (tabagisme, alcool, alimentation déséquilibrée), le sexe masculin, la ménopause, et certaines prédispositions génétiques (Lee et al., 2008).



**Figure 45 - Prévalence estimée du syndrome d'apnées obstructives du sommeil dans le monde.**  
(Benjafield et al. 2019)

L'élément identifié comme délétère dans le SAOS est la succession d'épisodes hypoxiques transitoires, appelés intermittentes (HI), entraînant une succession de baisse transitoires de la saturation sanguine en oxygène d'au moins 4 % (Destors et al. 2017; Lévy et al. 2015). Il existe une corrélation entre le SAOS et une élévation du risque cardiovasculaire (hypertension, insuffisance cardiaque, arythmies, athérosclérose, infarctus du myocarde et accident vasculaire cérébral) (Lévy et al. 2015; Drager et al. 2017). En effet, le SAOS et l'HI induite modifient l'hémodynamique et génèrent hypertension, dysfonction endothéliale, vieillissement artériel prématuré avec remodelage/rigidification incluant l'altération des fibres élastiques artérielles, inflammation vasculaire et hypertrophie cardiaque (Arnaud, Beguin, et al. 2011a; Lévy et al. 2015). Ces mécanismes élèvent le risque cardiovasculaire et la mortalité chez les patients apnéiques. De plus, plusieurs effets cardiovasculaires délétères du SAOS sont amplifiés avec le vieillissement, comme la rigidification des artères, l'élévation de

la pression sanguine nocturne et les arythmies, majorant ainsi le risque et la mortalité cardiovasculaires (Ancoli-Israel et al. 1996; Bliwise et al. 1988). Les troubles cardiovasculaires induits par l'HI sont multifactoriels mettant en cause une dysfonction endothéliale, l'activation du système nerveux sympathique, la stimulation de l'expression de l'hypoxia-induced factor-1 (HIF-1) et de l'endothéline (vasoconstricteur/hypertenseur), avec la production d'espèces réactives de l'oxygène (Figure 46) (Lévy et al. 2015).



**Figure 46 – Conséquences délétères de l'hypoxie intermittente.** (Lévy et al. 2015)

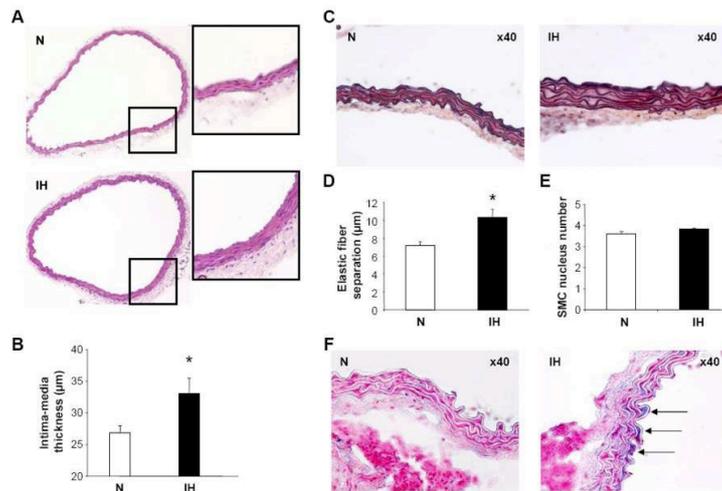
En premier lieu, l'HI provoque un stress oxydatif résultant d'un rapport pro-oxydant/anti-oxydant accru, principalement attribué à la réduction de la disponibilité de l'oxygène pendant les événements apnéiques et à la formation de ROS pendant la réoxygénation lorsque la respiration reprend (Lévy et al. 2015). De ce fait, l'HI provoque un dysfonctionnement mitochondrial, une activation de la NADPH oxydase (NOX) et de la xanthine oxydase (XO) ainsi qu'un découplage de la NO synthase (NOS), qui génère d'autres espèces réactives d'oxygène (ROS) plutôt que du NO. Les ROS ainsi formés vont avoir un impact direct en endommageant des biomolécules vitales (ADN, protéines, lipides ...) et en altérant les voies de signalisation physiologiques (Hoyos et al. 2015; Lavie 2015). Ce stress oxydatif va provoquer une cascade de processus inflammatoires via l'augmentation des facteurs de transcription

NF- $\kappa$ B et HIF-1 qui vont à leur tour augmenter l'expression de gènes codant pour certaines molécules inflammatoires comme les cytokines ou des facteurs de croissance (Lévy et al. 2015).

Enfin, l'HI va induire l'activation du système nerveux sympathique (Renaud Tamisier et al. 2015). Cette activation est directement médiée par l'HI puisqu'une étude a montré que des patients sains exposés deux semaines à un protocole d'HI présentent une hyperactivité sympathique (R. Tamisier, Pépin, et Lévy 2011). L'activation du système nerveux sympathique va entraîner des pics tensionnels répétés durant la nuit provoquant des modifications structurelles et fonctionnelles des vaisseaux, une activation du système rénine-angiotensine-aldostérone, une réduction de la production de NO ainsi qu'une augmentation du taux d'endothéline induisant une hypertension artérielle permanente (Lévy et al. 2015). Le stress oxydatif initie alors un cercle vicieux dans lequel il favorise l'activation sympathique et l'inflammation, qui à leur tour potentialisent le stress oxydatif générant des interactions délétères complexes et croisés à l'origine des troubles cardiovasculaires (Figure 46).

De plus, certaines études montrent que l'HI joue un rôle clé dans l'hypertension artérielle et l'athérosclérose. En effet, l'exposition de volontaires sains ou de rats à un protocole de 14 jours d'HI augmente leur pression artérielle en dehors de tous facteurs confondants. De plus, différentes études indiquent qu'il existe une corrélation entre l'HI et le développement de l'athérosclérose. Des études chez l'Homme montrent que les patients apnéiques présentent des signes précoces de développement de l'athérosclérose associés à une inflammation de bas grade (Drager et al. 2005). Ces observations ont été confirmées sur des modèles animaux d'HI qui montrent qu'un protocole de 14 jours d'HI provoque une dyslipémie associée à une inflammation systémique de bas grade et un remodelage vasculaire (Arnaud, Poulain, et al. 2011; Arnaud, Beguin, et al. 2011).

Du point de vue des conséquences structurelles, une étude sur des jeunes souris mâles exposées à un protocole d'HI de 14 jours a montré, dans l'aorte, l'apparition d'une hypertrophie des CMLVs de la média ainsi qu'un épaissement et une désorganisation des lames élastiques (Figure 47) (Arnaud, Beguin, et al. 2011).



**Figure 47 – Conséquence de l’hypoxie intermittente sur le remodelage vasculaire d’aortes de souris exposées à un protocole d’hypoxie intermittente de 14 jours.** Le remodelage vasculaire a été évalué chez des souris exposées à un protocole d’hypoxie intermittente (IH) ou à l’air (N) pendant 14 jours. (A) Coloration à l’hématoxyline-éosine (grossissement 10x10 et encarts agrandis numériquement). (B) Analyse histomorphométrique de l’épaisseur de l’intima-média, montrant un épaississement dû à l’HI, n=7 pour chaque groupe. (C) Coloration de Verhoeff montrant des fibres élastiques plus épaisses et incluant des clivages chez les souris IH (grossissement 10x40). La distance entre les fibres élastiques est augmentée par l’HI (D) du fait d’une hypertrophie des CMLVs et non d’une prolifération des CMLVs (E) dans la média (n=7 pour chaque groupe). (F) Coloration au bleu Alcian montrant des dépôts mucoïdes entre les fibres élastiques chez les souris IH (flèches, grossissement 10x40). (Arnaud, Beguin, et al. 2011b)

### 3.3 Altérations génétiques des composants des fibres élastiques et pathologies vasculaires

Les altérations acquises des fibres élastiques, principalement liées au vieillissement ou des pathologies tels que l’hypoxie intermittente, ne sont pas les seuls processus impliqués dans les pathologies du système cardiovasculaire. En effet, des altérations plus précoces de la matrice extracellulaire, notamment celles liées à des altérations génétiques des composants des fibres élastiques, et donc à un dérèglement précoce du processus de l’élastogénèse, sont également susceptibles de modifier fortement les propriétés de la paroi artérielle et de conduire à des pathologies cardiovasculaires.

#### 3.3.1 Atteintes génétiques des composants des fibres élastiques

L’élastogénèse est un processus complexe et multifactoriel, impliquant de nombreuses étapes successives. Ainsi, des mutations génétiques peuvent intervenir dans les gènes impliqués à tous les niveaux du processus d’élastogénèse et avoir des conséquences multiples en fonction de leur localisation et du niveau d’implication du gène dans la formation des fibres élastiques. Différentes pathologies ont ainsi été identifiées :

- Le syndrome de Marfan et l’arachnodactylie contracturale congénitale sont provoqués par une mutation au niveau des fibrillines, même si un syndrome apparenté au syndrome de Marfan peut être provoqué par des mutations dans le récepteur du TGF- $\beta$  (Ramirez et al. 2018; Coelho et Almeida 2020)
- Le syndrome de Hurler et le syndrome de Costello sont provoqués par un défaut d’assemblage des fibres élastiques lié à une forte concentration péri-cellulaire de glycosaminoglycanes (dermatane sulfate, chondroïtine sulfate)

- Le Cutis Laxa est provoqué par la sécrétion de tropoélastine non-fonctionnelle ou la mutation des gènes de la fibuline-4 ou -5
- Enfin, la sténose aortique supra- valvulaire (SASV) ainsi que le syndrome de Williams-Beuren (SWB) sont imputés à des mutations dans le gène de la tropoélastine.

### **3.3.1.1 Atteinte des fibrillines**

La déficience génétique dans le gène de la fibrilline-1 (deuxième composant majeur des fibres élastiques), à l'origine du syndrome de Marfan, conduit à une modification de la mécanique artérielle opposée à celles qui sont observées lors d'haploinsuffisance en élastine (SWB et SASV, chapitre 3.3.1.4). Le syndrome de Marfan est un trouble héréditaire autosomique-dominant du tissu conjonctif avec des manifestations cliniques importantes dans les systèmes cardiovasculaire, squelettique et oculaire. On observe en effet des dilatations aortiques, un affinement de l'épaisseur de la paroi artérielle, ainsi que des dissections et/ou des anévrismes aortiques chez les patients humains (Robinson et al. 2006; Du et al. 2021). C'est également le cas chez les souris modèles de cette pathologie (Mariko et al. 2011). La formation d'anévrisme et la dissection aortique restent les complications les plus dangereuses du syndrome de Marfan. Différentes études ont montré l'implication des EDP et de l'ERC dans l'évolution de la pathologie. En utilisant un modèle de souris hypomorphe à la fibrilline-1 (mgR/mgR), une étude a montré l'implication directe de l'EDP et de l'ERC dans le développement de l'AAA. Il a également été démontré que des injections intrapéritonéales de l'anticorps BA4 (dirigé contre la séquence de reconnaissance GxxPG de l'EBP) réduisent l'expression de MMP-2 et MMP-9, ainsi que la fragmentation de l'élastine et l'infiltration des macrophages dans l'aorte des animaux traités (Duca et al. 2016; Guo et al. 2013).

Outre le syndrome de Marfan, d'autres fibrillinopathies humaines, résultant de mutations dans un gène des fibrillines, sont connues et sont fréquemment associées à un assemblage aberrant des microfibrilles. Ces troubles comprennent l'arachnodactylie contracturale congénitale (ou syndrome de Beals lié à une atteinte de la fibrilline-2) ou encore le syndrome de Weill-Marchesani (lié à une mutation de la fibrilline-1) (Hubmacher et al. 2008).

### **3.3.1.2 Atteintes des fibulines**

Deux isoformes des fibulines, la fibuline-4 et -5 sont mises en causes dans certaines formes du syndrome de Cutis Laxa. La Cutis Laxa comprend différentes altérations héréditaires caractérisées par une peau lâche et ridée qui manque d'élasticité et donne un aspect âgé aux patients (Schmelzer et Duca 2022) :

- La Cutis Laxa autosomique récessive (ARCL) de type 1 résulte de mutations affectant la fibuline-4 ou la fibuline-5, entraînant des anévrismes aortiques ou un emphysème (Huchtagowder et al. 2006; Loeys et al. 2002).

Cependant, d'autres mutations génétiques, notamment une altération de la tropoélastine ou encore une mutation du gène de la pompe à protons ATP6VOA2

affectant le trafic des vésicules intracellulaires sont susceptibles de provoquer une Cutis Laxa (Huchtagowder et al. 2009; Hadj-Rabia et al. 2013).

### **3.3.1.3 Atteintes des LTBP**

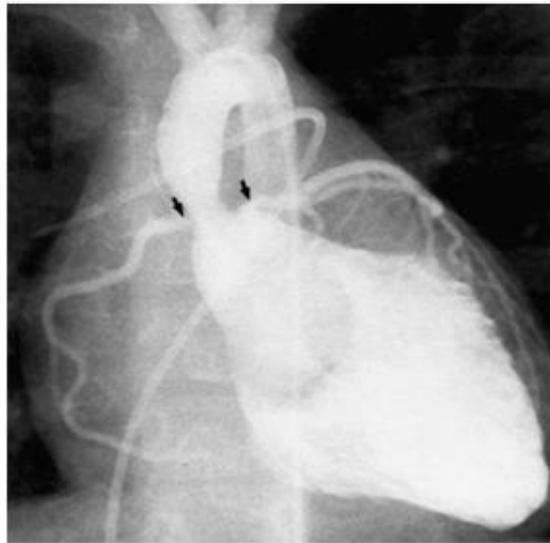
Des mutations dans les gènes des membres de la famille LTBP, entraînent plusieurs manifestations cliniques telles que le syndrome de Weill-Marchesani (WMS-like) caractérisé par des anomalies cardiovasculaires, oculaires et articulaires (Dagoneau et al. 2004). Dans ce trouble particulier, par exemple, il a été démontré que des mutations homozygotes c.3529G>A (p. Val1177Met) dans le gène LTBP2 provoquaient un syndrome autosomique récessif de type WMS, entraînant des altérations importantes des fibres élastiques et d'autres protéines de la MEC (Haji-Seyed-Javadi et al. 2012).

### **3.3.1.4 Atteintes du gène de la tropoélastine**

Les mutations dans le gène de la tropoélastine peuvent conduire à différents types d'affections, dont un point commun est la présence de sténoses de l'aorte ou, dans certains cas, d'autres grosses artères.

L'atteinte peut être limitée à la sténose de l'aorte, comme dans la sténose aortique supra-avalvulaire (SASV). Dans la SASV isolée, seul le gène de l'élastine (Eln), codant pour la tropoélastine est muté. Il s'agit d'une maladie génétique rare (1 naissance sur 20 000) qui se manifeste par un rétrécissement ou une obstruction de l'aorte ascendante, pouvant également être observée dans les artères coronaires, rénales, carotides ou pulmonaires (Figure 48). Dans ses formes sévères, elle peut conduire à une insuffisance cardiaque congestive précédée de phénomènes tels que l'hypertrophie ventriculaire gauche ou la dyspnée (Z. Urbán et al. 2001). Il existe un lien direct entre des mutations dans un des deux allèles du gène de l'élastine (hétérozygotie) et la survenue de la SASV (Curran et al. 1993; Ewart et al. 1993). En effet, plusieurs processus génétiques tels que des translocations, des mutations ponctuelles ou des délétions partielles affectant le gène de l'élastine peuvent conduire à des codons stop prématurés et à un ARNm instable. Le mécanisme commun, reconnu responsable de la SASV est l'haploinsuffisance en élastine (Micale et al. 2010). Dans ce processus, les CMLVs ne produisent que la moitié du niveau normal d'élastine requis, ce qui conduit à des fibres élastiques anormales et plus fines, mais aussi à une hyperprolifération des CMLVs (Zsolt Urbán et al. 2002). En effet, la tropoélastine présente en plus faible quantité joue de façon moins efficace son rôle d'inhibition de la prolifération des CMLVs. Ainsi, se forment de nouvelles couches de CMLVs, produisant chacune une nouvelle lame élastique (augmentation du nombre d'unités lamellaires), qui s'accumulent vers la lumière du vaisseau, entraînant ainsi progressivement une sténose artérielle (Karnik, Brooke, et al. 2003; D. Y. Li, Brooke, et al. 1998; Pober, Johnson, et Urban 2008). Il existe cependant une grande variation dans le caractère de gravité d'expression de la maladie chez les différents patients, ce qui indique que des gènes secondaires sont impliqués et modulés dans la pénétrance des conséquences de l'hémizygotie du gène de l'élastine (Kozel et al. 2011; Parrish et

al. 2020)



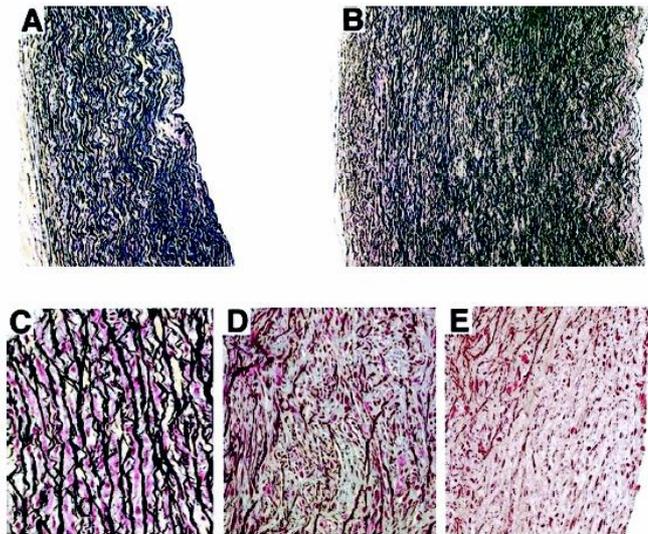
**Figure 48 - Angiogramme d'un patient de 4 ans atteint de SASV. Noter le rétrécissement important de l'aorte ascendante. De plus, les flèches noires indiquent les sténoses des artères coronaires gauche et droite de part et d'autre de la racine aortique.**(Stamm et al. 2001)

Le SASV peut également être associé à une autre pathologie génétique rare (entre 1 sur 20 000 et 1 sur 7500 naissances) : le syndrome de Williams-Beuren (SWB). En effet, le SWB est provoqué par la délétion d'une région entière (1,5–2 Mb) sur le chromosome 7q11.23, aboutissant à la perte totale d'un des deux allèles du gène de l'élastine et d'au moins 27 autres gènes de la même région chromosomique dont le gène NCF1 délété de façon variable dans le SWB qui régule la génération d'espèces réactives de l'oxygène dans la paroi vasculaire, réduisant ainsi le risque d'hypertension chez les personnes atteintes du SWB (Twite, Stenquist, et Ing 2019; Del Campo et al. 2006; Campuzano et al. 2012; Kozel et al. 2014). Le syndrome de Williams est un trouble multi-systémique associant entre autres un retard mental, des troubles du comportement, un faciès caractéristique, des anomalies au niveau des articulations (laxité/contracture), ainsi que des anomalies du développement des dents et des cordes vocales. Cependant, les anomalies cardiovasculaires sont présentes chez 80 % des patients atteints et constituent la principale cause de morbidité et de mortalité (R. T. Collins et al. 2010). En effet, le syndrome de Williams-Beuren est associé à des anomalies cardiovasculaires typiques liées à l'hétérozygotie pour le gène de l'élastine, notamment une hypertrophie de la paroi artérielle, une sténose aortique supra-avalvulaire (présente chez 55% des patients) due aux mêmes mécanismes que ceux décrits pour la SASV (diminution du rôle d'inhibition de la prolifération des CMLVs par la diminution de la quantité d'élastine et augmentation du nombre d'unité lamellaires), et/ou une sténose de l'artère pulmonaire pour 60% des patients. D'autres anomalies cardiaques structurales sont relativement fréquentes chez les patients, notamment la communication interventriculaire (8 %-21 %), le prolapsus de la valve mitrale (15 %) et l'insuffisance aortique (10 %). Une hypertension artérielle est

présente chez 40 à 50% des patients SWB. De façon étonnante, une étude sur 77 patients atteints du SWB a montré une élévation de la vitesse d'onde de pouls chez tous les patients de façon indépendante d'une hypertension (Kozel et al. 2014). Alors que l'hypertension et l'augmentation de la rigidité structurelle des artères se développent généralement de manière coïncidente dans les maladies cardiovasculaires acquises, leur dissociation dans le SWB peut indiquer que la réduction de la quantité d'élastine est un facteur causal commun (Cocciolone et al. 2018). De façon général, la plupart des études montrent que les patients SWB, à l'instar des souris *ELN<sup>+/-</sup>* présentent une augmentation de la rigidité artérielle. L'hypertension et les niveaux élevés de rénine circulante présents à la fois chez les souris *ELN<sup>+/-</sup>* et chez 40 à 50% des patients atteints du SWB suggèrent une implication générale du système rénine-angiotensine (Gilles Faury et al. 2003; Wagenseil et Mecham 2012; Kozel et al. 2014).

De plus, les patients atteints de SVAS présentent un risque accru de mort cardiaque subite, avec un risque encore plus élevé pour les patients SWB, ce qui pose problèmes, particulièrement lors d'anesthésies générales parfois nécessaires à l'ablation des sténoses (chapitre 4.1) (A. Wessel et al. 1994). La cause la plus fréquente de mort cardiaque subite est l'ischémie myocardique, résultant probablement de l'obstruction coronaire et de l'hypertrophie du ventricule gauche (Bird et al. 1996). L'ischémie peut également être causée par une réduction de la perfusion coronaire pendant la diastole en raison d'un effet Windkessel compromis. Une fonction Windkessel artérielle compromise augmenterait également la postcharge cardiaque et pourrait contribuer à l'hypertrophie du ventricule gauche (Cocciolone et al. 2018).

Du point de vue morphologique, les artères des patients SASV et SWB présentent un épaississement de la média aortique, résultant de la prolifération des CMLVs, de l'augmentation du nombre d'unités lamellaires, d'une néosynthèse de collagène et de lésions intimes, évoluant vers la lumière des vaisseaux et à fort risque de former une sténose de l'artère. A l'inverse de la structure extrêmement organisée de la paroi saine, les analyses histologiques de la paroi artérielle des patients atteints présentent des fibres élastiques fragmentées et désorganisées ainsi que des CMLVs orientées de façon aléatoire. Chez les patients SWB, les altérations des fibres élastiques aortiques et de leur organisation sont présentes dans les régions non sténotiques, mais sont encore plus marquées dans les régions sténotiques (Figure 49) (Zsolt Urbán et al. 2002)



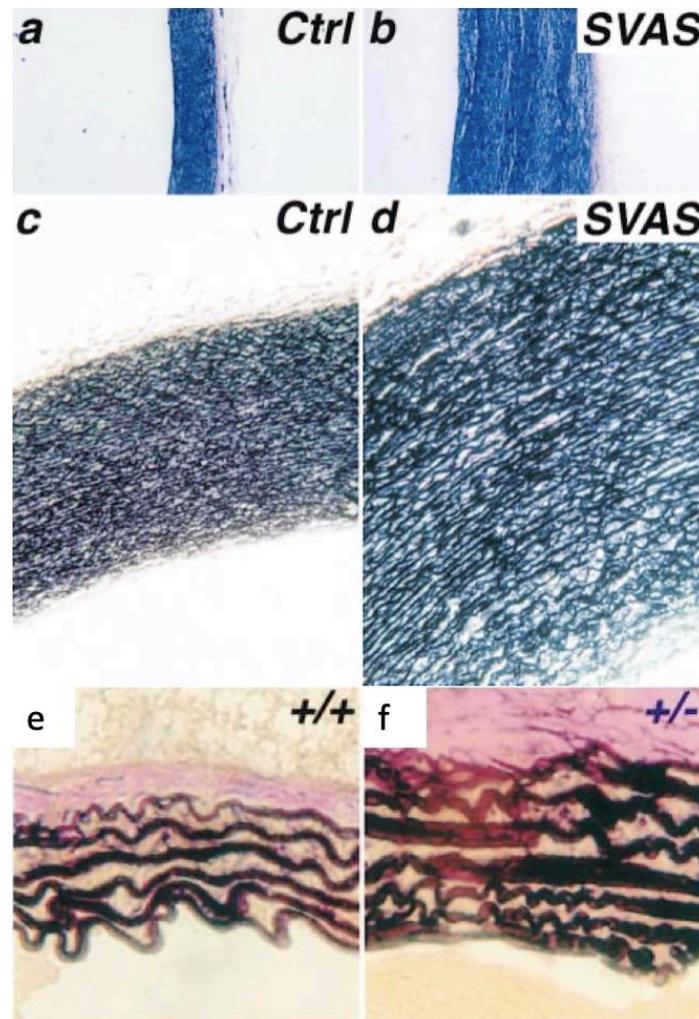
**Figure 49 – Coupe transversales d'aortes ascendante d'un patient atteinte du SWB (B) contre celle d'un individu sain (A).**

**A et B, photomicrographies représentatives comparant une section transversale de l'aorte ascendante d'un enfant sain de 2 ans (A) et la région non-sténotique de l'aorte ascendante d'un patient de 2 ans atteint de SWB (B) (coloration au pentachrome de Movat ; grossissement original  $\times 100$ ). Les régions non-sténotiques de l'aorte du SWB présentent un diamètre de paroi aortique supérieur à la normale, résultant d'une augmentation du nombre de couches de CMLVs entourées de lames élastiques anormalement fines. C-E, images de plus grande puissance de sections colorées au pentachrome de Movat (grossissement  $\times 400$ ), comparant la tunique moyenne de l'aorte d'un enfant sain de 2 ans (C) et les couches médiane (D) et néointimale (E) de la région sténosée de l'aorte d'un patient de 2 ans atteint de SWB. Contrairement à la tunique aortique normale composée de lames élastiques parallèles séparées par des couches uniques de CMLV, dans la région sténosée, l'architecture lamellaire de la tunique est désorganisée et contient de multiples groupes de CMLVs séparés par des fibres élastiques fines et fragmentées (D). L'épaississement intimal de l'aorte de la SWB est composé de nombreux CMLVs entourés d'une MEC pauvre en élastine (E). (Zsolt Urbán et al. 2002)**

Si elle n'est pas corrigée, la SASV conduit à une élévation de la pression intracardiaque et à une hypertrophie myocardique, qui peut aboutir à une défaillance cardiaque et au décès du patient. La seule stratégie thérapeutique validée à ce jour est de nature chirurgicale : aortoplastie, endarterectomie (Twite, Stenquist, et Ing 2019).

Afin de pouvoir étudier les mécanismes moléculaires en œuvre dans la SASV et le SWB, les équipes américaines du Dr Keating (*University of Utah, Salt Lake City, Utah*) et du Pr Mecham (*Washington University, St Louis, Missouri*) ont généré une souche de souris hémizygotés pour le gène de l'élastine (*El<sup>h+/−</sup>*), conçue pour reproduire l'anomalie génétique, et si possible du phénotype artériel, rencontrée dans ces deux pathologies (D. Y. Li, Brooke, et al. 1998; D. Y. Li, Faury, et al. 1998). Les premières études ont révélé un certain nombre de caractéristiques similaires entre ce modèle et les patients : une forte hypertension développée à l'âge adulte, une hypertrophie cardiaque ainsi qu'un remodelage de la paroi artérielle caractérisé par une augmentation du nombre de lames élastiques (+ 38%) malgré une réduction du contenu en élastine (-50%) se traduisant par une réduction du diamètre interne et une diminution de l'extensibilité de ces artères (D. Y. Li, Brooke, et al. 1998; D. Y. Li, Faury, et al. 1998; Gilles Faury et al. 2003). Ces résultats suggèrent ainsi qu'afin de

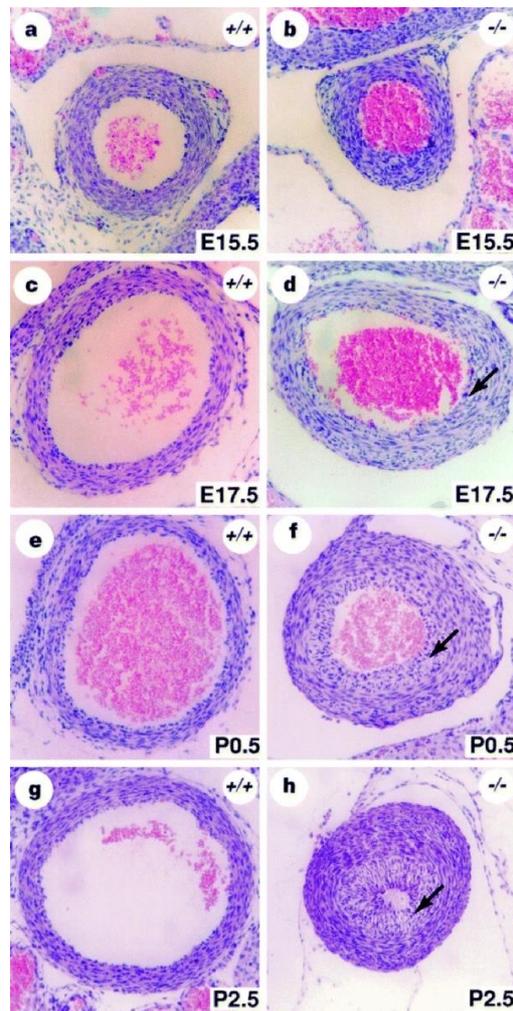
compenser la perte d'élasticité lié au déficit en élastine, les artères des souris  $Eln^{+/-}$  organisent aussi, comme les patients, des unités lamellaires supplémentaires au cours du développement (Figure 50).



**Figure 50 - coupes transversales d'aortes descendantes d'un témoin sain (a et c) et d'un humain atteint de SASV (b et d). Les aortes descendantes ont été examinées à 1,0 cm de distance de l'artère sous-clavière gauche et ne présentaient pas de sténose. Le faible grossissement des sections aortiques (a et b) montre l'augmentation marquée de l'épaisseur des échantillons de SASV. Un grossissement plus important (c et d) montre des lames élastiques 2,5 fois plus nombreuses dans les aortes d'un individu atteint du SASV. Aorte descendante de souris  $Eln^{+/+}$  présentant 6 lames élastiques (e) et  $Eln^{+/-}$  présentant 8 lames élastiques (f), ce qui indique une relation inverse entre l'expression de l'ELN et le nombre de lame élastiques. (d'après Li et al. 1998)**

Dans le but de mieux intégrer le rôle de l'élastine dans les pathologies cardiovasculaires, des souris entièrement déficientes pour l'élastine ont été générées ( $Eln^{-/-}$ ). L'hypothèse princeps, au vu du rôle essentiel structural de l'élastine, était qu'à l'instar du phénotype observé dans les mutations du collagène et de la fibrilline-1 (Pereira et al. 1997), une déficience totale en élastine conduirait à une dilatation artérielle, éventuellement jusqu'à la rupture. Comme attendu, les animaux ainsi générés ne sont pas viables et décèdent dans les 72h suivant la naissance, la cause

de la mortalité s'est avérée être des occlusions vasculaires causées par à une prolifération sous-endothéliale excessive et une accumulation de CMLVs (Figure 51) (D. Y. Li, Brooke, et al. 1998). Ainsi, les études chez les patients et dans les modèles animaux cités ci-dessus ( $Eln^{-/-}$  et  $Eln^{+/-}$ ) ont démontré pour la première fois que l'élastine possède d'autres fonctions que celle d'assurer l'élasticité. Il a été démontré que la prolifération accrue des cellules musculaires lisses artérielles, dans un état contractile quiescent, provenant des artères de patients souffrant du syndrome de Williams-Beuren est due à une diminution du dépôt d'élastine (Zsolt Urbán et al. 2002). Par conséquent, au-delà de l'élasticité, l'élastine agit également comme un facteur autocrine pour les CMLVs qui limite leur prolifération (Duca et al. 2016).



**Figure 51 – Effets de la déficience en élastine sur le développement précoce d'aortes ascendantes de souris** a-h, des coupes transversales d'aortes ascendantes (au niveau de l'artère pulmonaire) colorées à l'hématoxyline/éosine ont été examinées à E15,5 (a, b), E17,5 (c, d), P0,5 (e, f) et P2,5 (g, h). Aucune différence n'a été notée à E15,5. Les temps ultérieurs ont révélé une accumulation sous-endothéliale de cellules chez les souris  $ELN^{-/-}$  (flèches) et la quasi-oblitération de la lumière à P2,5. Toutes les souris  $ELN^{-/-}$  sont mortes avant P4,5, probablement à cause de l'oblitération rapide de l'aorte et des autres artères. Les rapports du poids des poumons par rapport au poids corporel et du poids du cœur par rapport au poids chez les souris  $ELN^{-/-}$  et  $ELN^{+/+}$  étaient comparables, ce qui suggère que l'œdème pulmonaire n'était pas la cause de la mort ( $n = 8$ ). Aucun signe d'hypertrophie, de dilatation ou d'ischémie cardiaques n'a été détecté à ce stade. (D. Y. Li, Brooke, et al. 1998)

### 3.4 Effet du sexe sur la rigidité artérielle

Comme nous l'avons vu, différentes conditions peuvent altérer la structure et la fonction cardiovasculaire, de façon différente selon les individus en fonction de leur génétique ou de leur mode de vie, mais également leur genre. Malgré le fait que le risque cardiovasculaire est similaire chez les hommes et les femmes âgés, il existe des différences liées au sexe pour les populations plus jeunes avec une diminution des risques pour les femmes. Le sexe masculin est d'ailleurs établi comme facteur de risque pour les maladies cardiovasculaire chez l'adulte (Ogola et al. 2018). Cette différence liée à l'âge et au sexe fait apparaître les œstrogènes comme un facteur de protection, car la ménopause est marquée par la perte de la production endogène d'œstrogènes chez les femmes, suivie par le rattrapage progressif du risque cardiovasculaire observé chez les hommes.

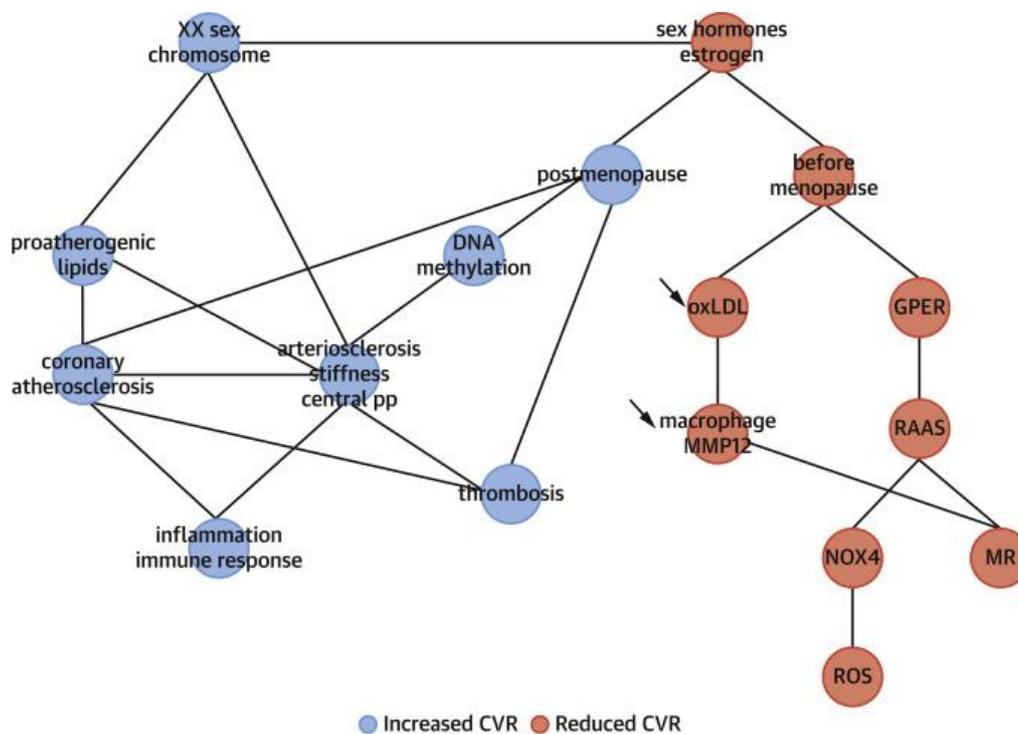
Différentes études présentent donc le sexe féminin comme un élément protecteur contre les maladies cardiovasculaires même si cette caractéristique est hautement dépendante de l'âge. En effet, les jeunes femmes ont une rigidité artérielle plus faible que celle des hommes, mais cette différence entre les sexes s'inverse au cours du vieillissement normal (Ogola et al. 2018). Ainsi, au cours de leurs années fertiles, les artères des femmes sont plus distensibles que celles des hommes et le risque de maladies cardiovasculaire est beaucoup plus faible (Jani et Rajkumar 2006; Ahimastos et al. 2003). Une autre étude a montré que les fibres élastiques et de collagènes sont moins rigides chez les femmes. De plus, ces dernières possèdent des isoformes de collagène spécifiques responsables de cette cardio-protection (Astrand et al. 2011). Une étude plus récente montre que l'atténuation par les œstrogènes de la sécrétion de MMP12 induite par les LDL oxydés dans les macrophages protège aussi les femmes de la rigidification artérielle (S.-L. Liu et al. 2019).

D'autres éléments sont également à prendre en compte :

- Les œstrogènes augmentent la biodisponibilité du NO dans le système vasculaire (Chambliss et Shaul 2002; Chakrabarti, Morton, et Davidge 2014)
- Les femmes ont des télomères plus longs que les hommes. Cet effet est principalement dû aux œstrogènes, qui ont des effets antioxydants et induisent une activité télomérase modérée. (Gruber et al. 2021).
- La prévalence de l'AAA est de 0 à 5 % chez les femmes et de 1 à 12 % chez les hommes (Altobelli et al. 2018).
- Une étude récente montre que les hormones sexuelles interfèrent avec plusieurs mécanismes physiopathologiques, tels que l'hypertrophie cardiaque, qui est favorisée par l'hormone mâle testostérone et inhibée par l'hormone femelle œstrogènes (Chen et al. 2021).

Enfin, une étude récente a montré sur des souris haploinsuffisantes pour l'élastine (*Eln<sup>+/-</sup>*) âgés de 6, 12 et 24 mois qu'il existe des interactions entre l'âge et le sexe ainsi qu'entre le génotype et le sexe, ce qui indique que les mâles et les femelles (et, en généralisant, possiblement les hommes et les femmes) suivent des cinétiques de remodelage cardiovasculaire différents avec le vieillissement et sont affectés de manière différente par la réduction du contenu en élastine. Leur étude montre par exemple que le module incrémental d'élasticité augmente avec l'âge seulement chez les femelles et non chez les mâles dans l'aorte ascendante. .

Des études expérimentales et certaines études cliniques ont attribué la plupart des effets protecteurs des œstrogènes à leur action modulatrice sur l'endothélium vasculaire. Les œstrogènes favorisent la production de NO d'origine endothéliale en augmentant l'expression et l'activité de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS), et modulent la libération de prostacycline et de thromboxane A2. La voie du thromboxane A2 est essentielle à la régulation du tonus vasculaire chez la femme (Novella et al. 2012). D'autres mécanismes impliquant les œstrogènes et les chromosomes sexuels sont également en jeu mais disparaissent après la ménopause avec la perte de production endogène de cette hormone (Figure 52) (Safar, Regnault, et Lacolley 2020; Lu et al. 2020). Pour autant, une hormonothérapie post-ménopause ne restaure pas les niveaux de protections liés à la période fertile indiquant que les processus en jeu sont plus complexes que la simple présence d'œstrogènes en quantité plus importante chez les femmes (Ogola et al. 2018).



**Figure 52 - Effet interdépendant des chromosomes sexuels et des hormones sur les maladies vasculaires chez la femme, avant et après ménopause. Le chromosome sexuel XX et un statut hormonal différent chez les femmes post-ménopausées augmentent le risque cardiovasculaire. GPER = G protein-coupled estrogen receptor; MMP = matrix metalloproteinase; MR = mineralocorticoid receptor; NOX = nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase; oxLDL = oxidized low-density lipoprotein; RAAS = renin-angiotensin-aldosterone system; ROS = reactive oxygen species. (Safar, Regnault, et Lacolley 2020)**

## 4 Actions visant à restaurer les propriétés mécaniques artérielles

La compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'artériosclérose mais plus généralement des troubles du système vasculaire entraînant des maladies cardiovasculaires est essentielle dans le but d'identifier les différents processus susceptibles d'être la cible de stratégies thérapeutiques (Figure 53). L'objectif est d'améliorer quantitativement ou qualitativement la mécanique vasculaire, et plus particulièrement celle des fibres élastiques, afin de limiter l'instauration d'une rigidité artérielle qui, nous l'avons vu, provoque de nombreux troubles pour tout l'organisme. Plusieurs études ont cherché à restaurer des niveaux physiologiques de rigidité artérielle à l'aide de traitements chirurgicaux, de modifications des modes de vie, ou de traitements pharmacologiques. Nous nous intéresserons ici particulièrement aux études et traitements cherchant à combler ou pallier un déficit en élastine.

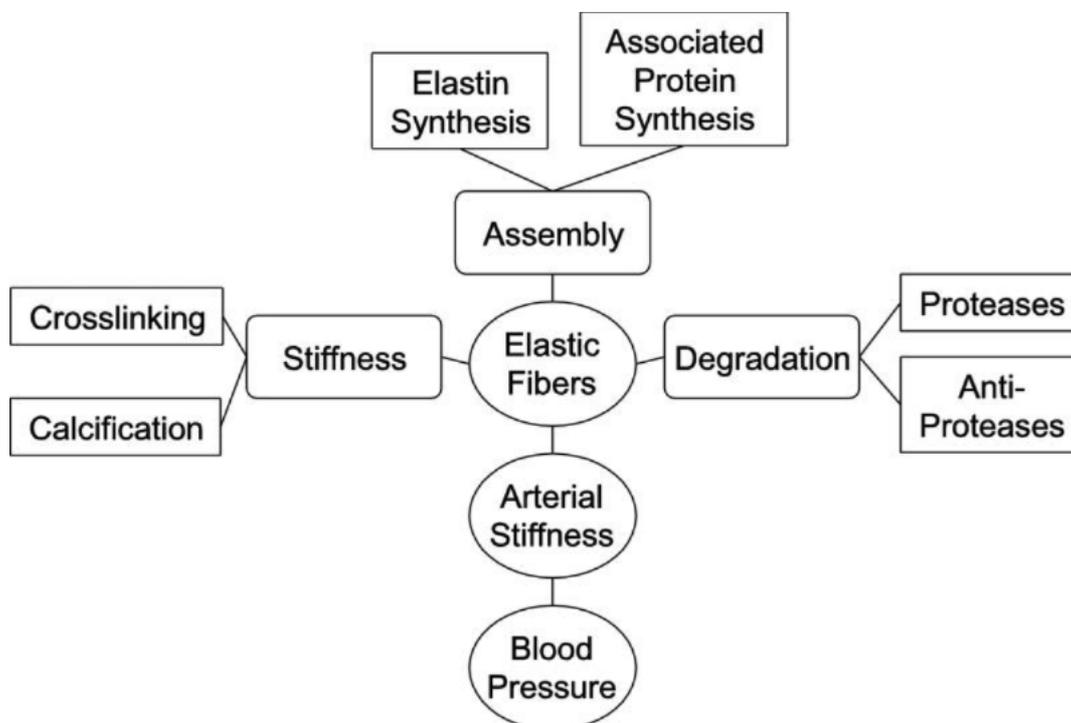
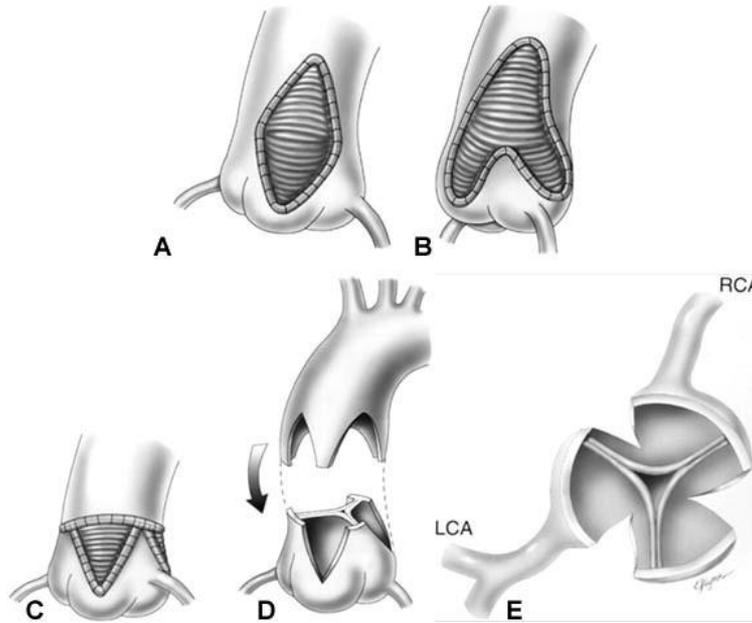


Figure 53 – Cibles possibles de stratégies thérapeutiques visant à modifier les fibres élastiques et à influencer sur la rigidité artérielle et la pression artérielle. (Wagenseil et Mecham 2012)

### 4.1 Traitements chirurgicaux

Dans certaines pathologies comme le SWB ou le SASV, les sténoses vasculaires sont tellement importantes et délétères pour la santé ou la survie qu'ils nécessitent une intervention chirurgicale. Toutes les chirurgies ont pour but d'élargir la lumière de la zone sténotique de l'aorte, en incisant la paroi en un ou plusieurs points et en maintenant écartés les bords de l'incision par la pose de patches, ou par transection de l'aorte, incisions et adaptation de l'aorte distale. Quatre techniques chirurgicales sont le plus souvent utilisées pour traiter la sténose aortique supra- et sous-valvulaire :

- A) un patch unique en forme de losange qui s'étend dans l'un des sinus de Valsalva,
- B) deux incisions dans deux des sinus et pose d'un patch en Y inversé qui s'étend dans ces deux sinus,
- C) trois incisions, une dans chacun des trois sinus, et pose de trois patches, un dans chacun des trois sinus,
- D) Transection de l'aorte, incisions dans les 3 sinus, adaptation correspondante de l'aorte distale, et réanastomose (Figure 54) (Stamm et al. 1999).



**Figure 54 - Techniques chirurgicales utilisées pour le soulagement de la sténose aortique supravalvulaire.** A. Patch en forme de losange ou de goutte d'eau s'étendant dans le sinus non coronaire. B. Insertion d'un patch bifurqué inversé s'étendant dans les sinus non coronaires et coronaire droit (aortoplastie étendue). C. Transection de l'aorte, incisions et insertions de patch dans les 3 sinus, et réanastomose (technique de Brom). D. Transection de l'aorte, incisions dans les 3 sinus, adaptation correspondante de l'aorte distale, et réanastomose. E. Positions des incisions des 3 sinus par rapport aux artères coronaires. RCA, artère coronaire droite ; LCA, artère coronaire gauche. (Stamm et al. 1999)

La récurrence de la sténose est fréquente après une réparation de la SVAS, environ un tiers des patients subissent une réintervention dans les 20 ans suivant la chirurgie initiale (Stamm et al. 1999). La majorité des réinterventions de la SVAS chez les patients atteints de SWB se produisent dans les deux premières années après la chirurgie initiale (Wu et al. 2019). Les facteurs de risque de réintervention du SVAS comprennent l'âge inférieur à 1 an au moment de la chirurgie, le poids inférieur à 5 kg, la réparation concomitante d'une obstruction de la sortie du ventricule droit, ainsi que les petites tailles de la valve aortique, de la racine et de l'aorte ascendante (Wu et al. 2019). Ces interventions chirurgicales sont à programmer avec grande attention puisque les patients atteints de SWB présentent un risque accru de mort cardiaque subite et d'événements cardiaques indésirables majeurs, particulièrement au cours des anesthésies. La mort cardiaque subite chez les SWB est 25 à 100 fois plus fréquente que dans la population générale. Les raisons de ce risque accru n'ont pas encore été entièrement élucidées et pourraient être multifactorielles (Armin Wessel et al. 2004; Bird et al. 1996; R. T. Collins 2011). La majorité des collapsus cardiovasculaires et des décès chez les SWB opérés surviennent dans le cadre périprocédural et péri-anesthésique (Collins et al. 2017; Burch et al. 2008). Les morts

cardiaques subites chez les SWB surviennent généralement au début ou à la fin de la procédure, qu'ils sont souvent caractérisés par une survenue rapide et il est généralement difficile de réanimer les patients avec succès (Collins et al. 2017). D'autres stratégies chirurgicales de restauration de la fonction cardiaque sont étudiées, comme l'utilisation de biomatériaux à base d'élastine sous forme d'hydrogels capable de former un échafaudage permettant de couvrir ou réparer la zone atteinte ou encore des bio-stents recouverts d'élastine qui pourraient contribuer à restaurer la fonction cardiaque. Bien que prometteurs, ces produits doivent encore être améliorés pour être parfaitement fonctionnels (Gonzalez de Torre, Alonso, et Rodriguez-Cabello 2020).

## **4.2 Traitements préventifs liés à l'hygiène de vie**

L'exercice physique, la perte de poids des personnes obèses ainsi qu'une alimentation adaptée sont recommandés afin de prévenir les maladies cardiovasculaires. En outre, la perte de poids des personnes obèses est fortement recommandée pour les patients atteints de SAOS, puisqu'une perte de poids est un bon facteur pronostique (Lévy et al. 2015). Une alimentation et une pratique d'exercices physiques adaptés sont également favorables à la réduction du développement des troubles cardiovasculaires chez les personnes âgées (Arnett et al. 2019). Ainsi, dans ses recommandations, l'American Heart association recommande à tous les adultes « d'adopter un régime alimentaire sain mettant l'accent sur la consommation de légumes, de fruits, de noix, de céréales complètes, de protéines végétales ou animales maigres et de poisson, et qui minimise la consommation de graisses trans, de viande rouge et de viande rouge transformée, de glucides raffinés et de boissons sucrées. Pour les adultes souffrant de surpoids et d'obésité, des conseils et une restriction calorique sont recommandés pour atteindre et maintenir la perte de poids. Les adultes doivent pratiquer au moins 150 minutes par semaine d'activité physique d'intensité modérée accumulée ou 75 minutes par semaine d'activité physique d'intensité vigoureuse» (Arnett et al. 2019). Des études montrent qu'il existe un intérêt significatif d'amélioration du mode de vie, y compris des stratégies alimentaires/nutritionnelles, pour prévenir ou inverser la rigidification artérielle et le dysfonctionnement endothélial liés à l'âge (LaRocca, Martens, et Seals 2017).

### **4.2.1 La nutrition**

Plusieurs études épidémiologiques indiquent que les régimes méditerranéens, riches en graisses monoinsaturées mais également en resvératrol, et surtout pauvre en graisses saturées sont associés à un risque significativement réduit de maladies cardiovasculaires (Martínez-González, Gea, et Ruiz-Canela 2019). Ainsi, plusieurs études ont montré une réduction de la rigidité artérielle et une amélioration de la fonction endothéliale en lien avec le régime méditerranéen (J. Lee et al. 2015; Blumenthal et al. 2010; Klonizakis et al. 2013). D'autres part, une alimentation riche en fruits, légumes, fibres et poissons sont également associés à une amélioration des phénotypes du vieillissement artériel (LaRocca, Martens, et Seals 2017). Les mécanismes exacts ne sont pas encore identifiés mais il semblerait que la réduction du stress oxydatif et de l'inflammation joue un rôle majeur (Chistiakov et al. 2015; Marín et al. 2013). Au même titre que la qualité de l'alimentation, la quantité présente également une importance majeure. En effet, la restriction énergétique en l'absence de malnutrition (restriction calorique) est associée à des effets bénéfiques sur de

nombreux paramètres physiologiques du vieillissement (Ingram et al. 2006; Mattson et al. 2014). En outre, l'alimentation pourrait également avoir un effet sur la longueur des télomères (corrélée selon certaines études à la rigidité artérielle) (Y.-Y. Wang et al. 2011). En particulier, des effets des vitamines sur l'homéostasie des télomères semblent être médiés par leurs propriétés antioxydantes et la prévention des dommages à l'ADN (Gruber et al. 2021).

#### **4.2.2 L'exercice physique**

L'exercice physique améliore de multiples indicateurs de la santé artérielle chez les humains (Jablonski et al. 2015) et dans les modèles animaux (Gu et al. 2014).

Différentes études ont montré des effets bénéfiques de l'exercice physique sur la réduction des risques cardiovasculaires. Cependant, les effets sont parfois difficiles à interpréter du fait des différences de protocoles d'exercices physiques. Ainsi, plusieurs méta-analyses offrant un regard plus global ont été réalisées. Il a été démontré que l'exercice aérobic et l'exercice de résistance diminue de manière significative la pression artérielle systolique. Parallèlement, l'exercice aérobic et l'exercice combiné diminuent considérablement la rigidité artérielle centrale et la fonction cardiaque chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires (Zhang et al. 2018). Une méta-analyse récente a également montré que la vitesse de l'onde de pouls (donc la rigidité artérielle) est réduite 30 min après un exercice physique, bien que son niveau soit restauré dans les 24h. Cela pourrait suggérer la nécessité de la pratique d'un exercice quotidien pour obtenir une réduction de la rigidité artérielle durable (Saz-Lara et al. 2021). A l'instar d'une alimentation saine, une activité physique régulière contribue également à la préservation de la longueur des télomères en réduisant le stress oxydatif de façon durable et les mécanismes inflammatoires. Il a été également démontré que l'exercice physique augmente l'activité de la télomérase (Arsenis et al. 2017; Balan, Decottignies, et Deldicque 2018; Semeraro et al. 2020).

### **4.3 Traitements pharmacologiques visant à corriger les altérations de la matrice extracellulaire**

#### **4.3.1 Inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) et bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine II**

L'un des acteurs de la pathogénèse artérielle lors du vieillissement est le système rénine/angiotensine/aldostérone (SRAA) ; en particulier l'angiotensine II dont le rôle a été démontré dans l'hypertrophie de la paroi vasculaire médié par la stimulation de la formation des collagènes et la diminution de la synthèse d'élastine. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion sont des antihypertenseurs bloquant la production d'angiotensine II. De par leurs effets sur la réduction de la pression artérielle via l'inhibition du SRAA, les IEC limitent le remodelage vasculaire pathologique avec des effets bénéfiques sur la rigidité artérielle (diminution de vitesse d'onde de pouls) (Cavalcante et al. 2011). Une étude a également montré sur un modèle animal de calcification, que l'administration d'IEC, diminue la calcification aortique et donc la rigidité artérielle (Wagenseil et Mecham 2012). Cependant, aucun effet sur le contenu en élastine n'a été observé (Halabi et al. 2015). Plusieurs études ont montré l'intérêt du losartan (bloqueur du récepteur de l'angiotensine II) pour prévenir l'apparition d'anévrismes de l'aorte chez des patients atteints du syndrome de Marfan ainsi que

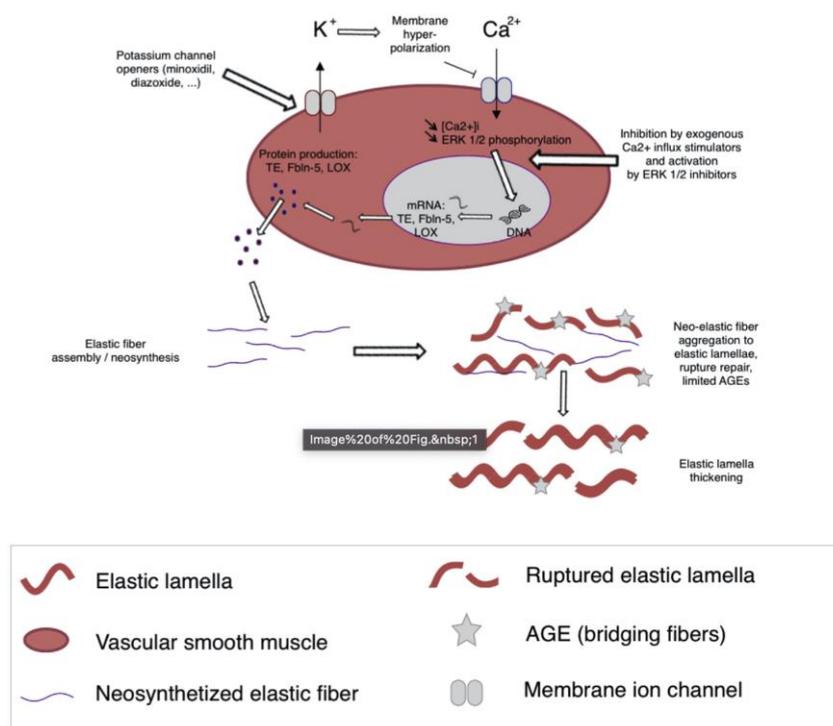
chez des souris génétiquement déficientes pour la Fbn1 (Teixido-Tura et al. 2018; Matt et al. 2008; Habashi et al. 2006).

### 4.3.2 Ouvreurs des canaux potassiques (KATP)

Les canaux potassiques sensibles à l'ATP (canaux  $K_{ATP}$ ) sont des structures transmembranaires impliquées dans la régulation de nombreuses fonctions, comme l'excitabilité neuronale, la sécrétion d'insuline au niveau des cellules  $\beta$  pancréatiques (Soriano et al., 2011) et la régulation de la contraction des cellules musculaires lisses, en particulier vasculaire. Différents agents pharmacologiques peuvent agir comme ouvreurs (minoxidil, nicorandil, diazoxide) ou comme bloqueurs (glibenclamide) de ces canaux. Au niveau vasculaire, les ouvreurs de canaux potassiques provoquent une hyperpolarisation des CMLVs, induisant une fermeture des canaux calciques voltages dépendants et donc une réduction de la concentration de calcium intracellulaire, relaxant ainsi les CMLVs et provoquant une vasodilatation (Wassim Fhayli et al. 2019a). Plusieurs études ont été réalisées sur la capacité des ouvreurs de canaux potassiques à induire une néo-synthèse d'élastine et à impacter la rigidité vasculaire. En effet, il avait été montré ultérieurement qu'un excès de  $K^+$  dans le milieu extracellulaire induit la dépolarisation de la membrane plasmique, ce qui provoque l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants (CaV) et conduit à une augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  et à une diminution de la synthèse d'élastine (A. Hayashi et al. 1994; Tokimitsu et Tajima 1994). Ultérieurement, il a été montré que, de manière inverse, l'efflux de  $K^+$  des cellules conduit à une augmentation de la synthèse d'élastine en raison de l'hyperpolarisation de la membrane et de la fermeture des CaV. Cela a été démontré dans des expériences utilisant l'ouvreurs de canaux  $K_{ATP}$  : minoxidil. Ainsi, l'efflux de  $K^+$  induit par le minoxidil entraîne une augmentation de la synthèse d'élastine dans les CMLVs en culture et les fibroblastes de la peau (A. Hayashi et al. 1994; Tajima et al. 1995). Des études *in vivo* ont également démontré que la teneur en élastine et l'épaisseur des lames élastiques artérielles sont augmentées par le traitement au minoxidil dans plusieurs modèles animaux, notamment les souris  $Eln^{+/-}$  (Slove et al. 2013; Coquand-Gandit et al. 2017; Knutsen et al. 2018). Le traitement chronique de souris par le minoxidil entraîne également une amélioration de la mécanique artérielle et de la perfusion cérébrale et, au moins chez les animaux âgés, une néosynthèse des fibres élastiques et une protection des fibres élastiques existantes (Coquand-Gandit et al. 2017; Knutsen et al. 2018; Fhayli, Boëté et al. 2019). Cependant, des essais cliniques récents concernant l'utilisation du minoxidil dans le but de réduire l'épaisseur intima/média et la rigidité artérielle ou limiter les vasculopathies pulmonaires chez des enfants atteints du syndrome Williams Beuren n'ont pas abouti à un effet probant du traitement (Kassai et al. 2019; Knutsen et al. 2022). Il est toutefois important de noter que les doses autorisées chez l'humain sont beaucoup plus faibles que celles utilisées chez la souris et la durée relative du traitement chez l'humain (1 an, soit  $1/80^e$  de la durée de vie) est aussi beaucoup plus faible que celle réalisée chez les souris (3 mois, soit  $1/8^e$  de la durée de vie) (Kassai et al. 2019). D'autres ouvreurs de canaux  $K_{ATP}$ , comme le diazoxide ou le nicorandil, exercent chez le rat un effet sur la synthèse d'élastine *in vivo* similaire à ceux induits par le minoxidil chez la souris (Slove et al. 2013; Raveaud et al. 2009), tandis que le pinacidil et certains dérivés du cromakalim ou du diazoxide ont également été montrés comme induisant la production d'élastine par des CMLVs en culture chez le rat (Figure 55) (Slove et al. 2013; Bouhedja et al. 2018; Bouider et al. 2015; Wassim Fhayli et al. 2019a).

### 4.3.3 Inhibition de la voie de signalisation Ras/MEK/ERK

De nombreuses cytokines qui inhibent la transcription de la tropoélastine agissent par l'activation de la voie de signalisation Ras/MEK/ERK (Sproul et Argraves 2013). L'augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  dans les CMLVs stimule également la phosphorylation de ERK1/2. L'inhibition de cette voie de signalisation a donc été suggérée comme pouvant être une stratégie pour augmenter la teneur en élastine dans les artères. Des expériences *in vitro* et *in vivo* chez le rat, ont démontré que l'inhibition de la phosphorylation de ERK1/2 conduit à une augmentation de la synthèse d'élastine par les CMLVs et du contenu en élastine de l'aorte (Lannoy et al. 2014). L'importance de cette voie dans le métabolisme de l'élastine a été confirmée par la démonstration que la cortistatine réduit la dégradation de l'élastine, les expressions de MMP-2 et -9 et la progression de l'anévrisme par l'inhibition des voies de signalisation ERK1/2 (Chai et al. 2018).



**Figure 55 - Événements cellulaires et voies de signalisation impliqués dans la néosynthèse des fibres élastiques induite par des traitements pharmacologiques.** L'application d'ouvreurs de canaux potassiques sur les CMLVs entraîne une hyperpolarisation de la membrane cellulaire et un blocage des canaux calciques. Ceci induit une baisse de la concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$  et l'inhibition de la voie ERK 1/2, résultant en l'activation de la production d'ARNm impliqués dans la synthèse des fibres élastiques (tropoélastine, TE ; fibuline-5, FBLN-5 ; lysyl-oxydase, LOX ; fibrilline-1, FBN-1 ; ...) et la sécrétion des protéines correspondantes. Le traitement des cellules avec un inhibiteur de la phosphorylation ERK 1/2 produit le même effet sur l'élastine. La néosynthèse des fibres élastiques précède alors leur intégration/agrégation dans les fibres élastiques et les lames élastiques préexistantes. Concernant l'effet du minoxidil, une limitation des ruptures de fibres élastiques et de la formation d'AGE est également observée. (Fhayli, Boëté et al. 2019)

#### 4.3.4 Traitement par l'extrait d'aneth

Une étude a été réalisée pour tester l'effet d'extrait d'aneth pour induire l'expression du gène de la lysyl oxidase-like (Loxl) dans les fibroblastes dermiques. Cette étude montre que l'aneth induit une augmentation de la teneur en élastine dans les équivalents dermiques et cutanés ainsi qu'une augmentation de l'élasticité de la peau *in vivo* chez l'Homme (Cenizo et al. 2006; Sohm et al. 2011). Récemment, l'effet de l'aneth a été confirmé démontrant qu'une administration chronique (3 mois) d'extrait d'aneth sur une population de souris mâles âgée induit une néosynthèse des fibres élastiques et une diminution de la rigidité de l'aorte ascendante. Ces effets sont également corrélés à une élévation de l'expression des gènes *Loxl-1* et *En* dans l'aorte ainsi que de la production d'élastine par les CMLVs. Le traitement par l'aneth est également capable de supprimer l'hypertrophie cardiaque liée à l'âge présente dans le groupe non traité (Fhayli, Boété et al. 2020)

#### 4.3.5 Blocage de l'interaction EDP/ERC et des voies de signalisation médiées par l'ERC

Le blocage de la liaison des EDP à la sous-unité EBP de l'ERC peut être réalisé en utilisant le peptide V14 (VVGSPSAQDEASPL) ou des galactosides. Le peptide V14 imite la séquence EBP sur laquelle les EDP se lient. Par conséquent, le peptide V14 a le potentiel de piéger les EDP circulants, bloquant ainsi leurs effets biologiques (Robinet et al. 2007; Toupance et al. 2012). Une autre possibilité est d'utiliser des galactosucres, du lactose ou du sulfate de chondroïtine, car leur interaction avec l'EBP conduit à la dissociation des EDP liés à l'ERC et au blocage des voies de signalisation correspondantes. Ces composés ont été utilisés pour démontrer les effets bénéfiques des EDP dans la cardioprotection contre les lésions d'ischémie/reperfusion (Robinet et al. 2007) Bien que le peptide V14 et les galactosucres aient permis une meilleure compréhension dans le domaine de la biologie des EDP, leur délivrance sélective au site de la lésion vasculaire reste un problème (Duca et al. 2016).

#### 4.3.6 Inhibition de l'activité de la sialidase Neu-1

Une autre stratégie envisagée d'inhibition des voies de signalisation médiées par l'ERC est basée sur le blocage de l'activation de Neu-1 après la liaison des EDPs au récepteur. En raison du manque d'inhibiteurs sélectifs, la majorité des études entreprises à ce jour utilisent l'acide 2-désoxy-2,3-didéhydro-N-acétylneuraminique (DANA) comme inhibiteur de sialidase (Scandolera et al. 2015; Gayral et al. 2014; Blaise et al. 2013; Tembely et al. 2022). Cependant, ce composé n'est pas spécifique à Neu-1 et inhibe toutes les sialidases, ce qui exclut son utilisation thérapeutique. Différentes tentatives ont été entreprises pour concevoir et/ou synthétiser des inhibiteurs des neuraminidases humaines, comme les dérivés c9-amides du DANA dont l'un des dérivé (le c9-BA-DANA) s'est révélé 200 fois plus sélectif pour la NEU-1 humaine que pour la NEU-2,-3 et -4 par rapport au DANA (Magesh et al. 2009). Des études plus récentes se basent sur l'utilisation de peptides interférents ciblant le domaine transmembranaire 316-333 (appelé TM2) capable de former une interface de dimérisation contrôlant l'activité catalytique de Neu-1. Les peptides interférents utilisés sont capables d'interagir avec le TM2 de Neu-1, de perturber la dimérisation membranaire de Neu-1 pour ainsi inhiber son activité sialidase, des études

complémentaires *in vivo* confirmant le potentiel de cette stratégie doivent être menées (Albrecht et al. 2020).

## 5 Nouvelle stratégie thérapeutique, résultats préliminaires et hypothèse de travail

Longtemps considérée comme un réseau de soutien inerte pour les cellules, la MEC vasculaire est en fait une structure active et dynamique qui joue un rôle central dans le vieillissement vasculaire et les complications associées. Au cours de la dernière décennie, la fragmentation de l'élastine et la génération d'EDP sont apparues comme des facteurs majeurs du remodelage de la MEC vasculaire et des maladies associées au vieillissement. En dehors de la chirurgie (angioplastie, stenting et pontage coronarien par exemple) qui ne s'attaque pas aux causes profondes et dont le rapport bénéfice/risque doit être soigneusement évalué, il n'existe actuellement aucun traitement pharmacologique validé cliniquement pour prévenir, bloquer ou traiter une perte d'élasticité artérielle malgré un certain nombre de recherches prometteuses.

L'une des stratégies consiste à relancer la production ou à réparer les fibres élastiques existantes. Les ouvreurs de canaux potassiques ont montré un potentiel intéressant de néo-production d'élastine et de fibres élastiques, ainsi que d'amélioration de l'élasticité artérielle chez les souris âgées ou hémizygotés pour le gène de l'élastine. Cependant, à ce jour, des effets secondaires ou un manque d'efficacité chez l'Homme stoppent ces traitements au stade des essais cliniques, qui permettent l'usage de doses et des durées de traitement bien plus faibles que chez l'animal. C'est le cas du minoxidil, dont l'effet sur l'Homme n'a pas confirmé son potentiel établi chez l'animal (Kassai et al. 2019; Knutsen et al. 2022). Il est intéressant de noter que la tropoélastine a été utilisée avec succès *in vitro* pour restaurer un phénotype prolifératif normal pour les CMLVs issues de patients atteints du SWB qui présentent un phénotype hyperprolifératif *in vitro* (Ge et al. 2012). De plus, des stents fonctionnalisés avec des fragments d'élastine ou de tropoélastine à leur surface ont été proposés pour prévenir la resténose *in vivo*. Bien que cette stratégie ait eu un impact significatif sur la sténose, elle n'a pas réduit la rigidité de la paroi artérielle, n'a eu aucun effet sur l'hypertension et les composés élastiques exogènes n'ont pas été intégrés au réseau élastique endogène (Karnik, Brooke, et al. 2003; Karnik, Wythe, et al. 2003; de Torre et al. 2015).

Il apparaît donc, d'un point de vue biomécanique, que l'introduction d'une molécule artificielle exogène favorisant l'élasticité au sein de la paroi artérielle et/ou capable d'induire une signalisation *via* les récepteurs de l'élastine serait l'action la plus simple pour stopper la rigidification artérielle. Le projet Arterylastic propose l'utilisation d'une protéine élastique synthétique (SEP) originale inspirée de la tropoélastine humaine native (hTE) visant à restaurer la fonction et les propriétés mécaniques des artères présentant des fibres élastiques endommagées ou dysfonctionnelles.

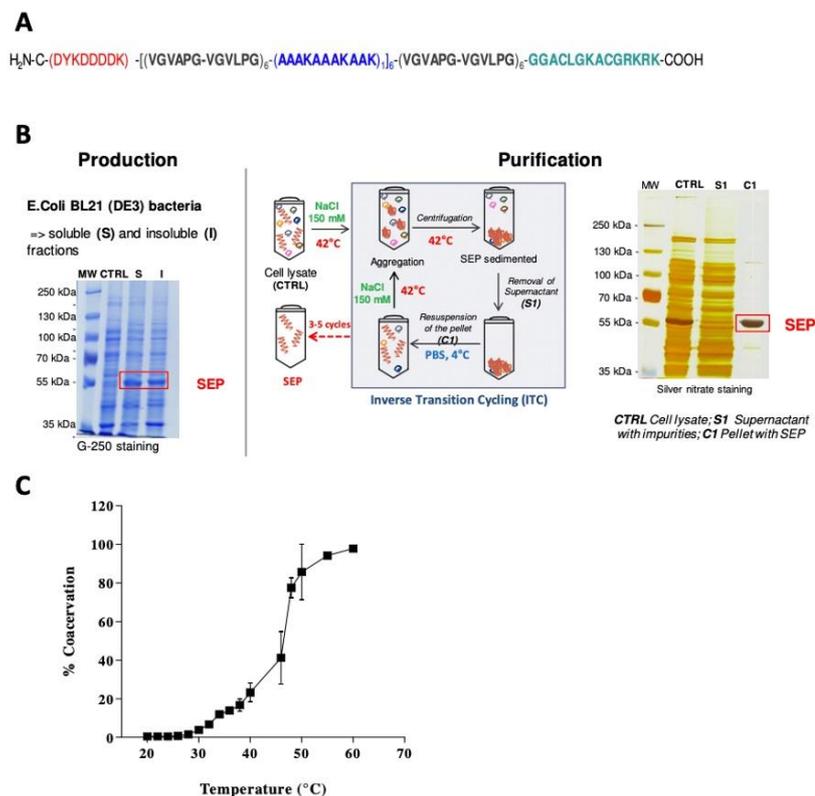
### 5.1 Explication de la stratégie et conception de la SEP

La SEP est un polypeptide inspiré de la tropoélastine humaine. Elle est composée d'une alternance de domaines hydrophobes (VGVAPG-VGVLPG lui assurant ses propriétés élastiques) et de domaines de réticulation (AAAKAAAKAAK) correspondant à des motifs hautement conservés parmi les espèces (Figure 56A). La principale innovation proposée par la SEP en comparaison avec les autres polypeptides élastiques existants est la présence du domaine 36 de la tropoélastine humaine en région C-terminale. En effet, ce motif présente un intérêt particulier du fait de son rôle

dans la protéine native afin d'aboutir à un assemblage optimal des fibres élastiques. Ce domaine 36 assure en effet l'interaction entre l'élastine et les microfibrilles ainsi qu'avec l'intégrine de surface  $\alpha\beta3$  via deux motifs particuliers, le motif RKRK et la formation d'un pont disulfure entre les deux cystéines séparées par quatre acides aminés (Nonaka, Sato, et Wachi 2014).

Le gène codant pour la SEP a été cloné dans un vecteur d'expression procaryote pour permettre une production à grande échelle dans un système bactérien (*E. Coli*). La SEP peut facilement être purifiée à partir du lysat cellulaire par cycle de transition inverse (ITC) (Figure 56B). Cette purification est facilitée par les propriétés intrinsèques de coacervation de la SEP. En effet, le profil thermique de la SEP a montré que la protéine synthétique est capable de former des agrégats de façon réversible à partir de 30°C (température de transition) (Figure 56C). Ce qui signifie que si la SEP est capable de passer la barrière endothéliale pour rejoindre la média, elle pourrait former de nouvelles lames élastiques et/ou réparer les lames élastiques existantes. Enfin, afin d'être en capacité de retrouver la SEP in vivo et in vitro lors des expérimentations, un octapeptide FLAG a été ajouté au niveau de la région N-terminale de façon à limiter l'impact du FLAG sur les caractéristiques physico-chimiques de la SEP.

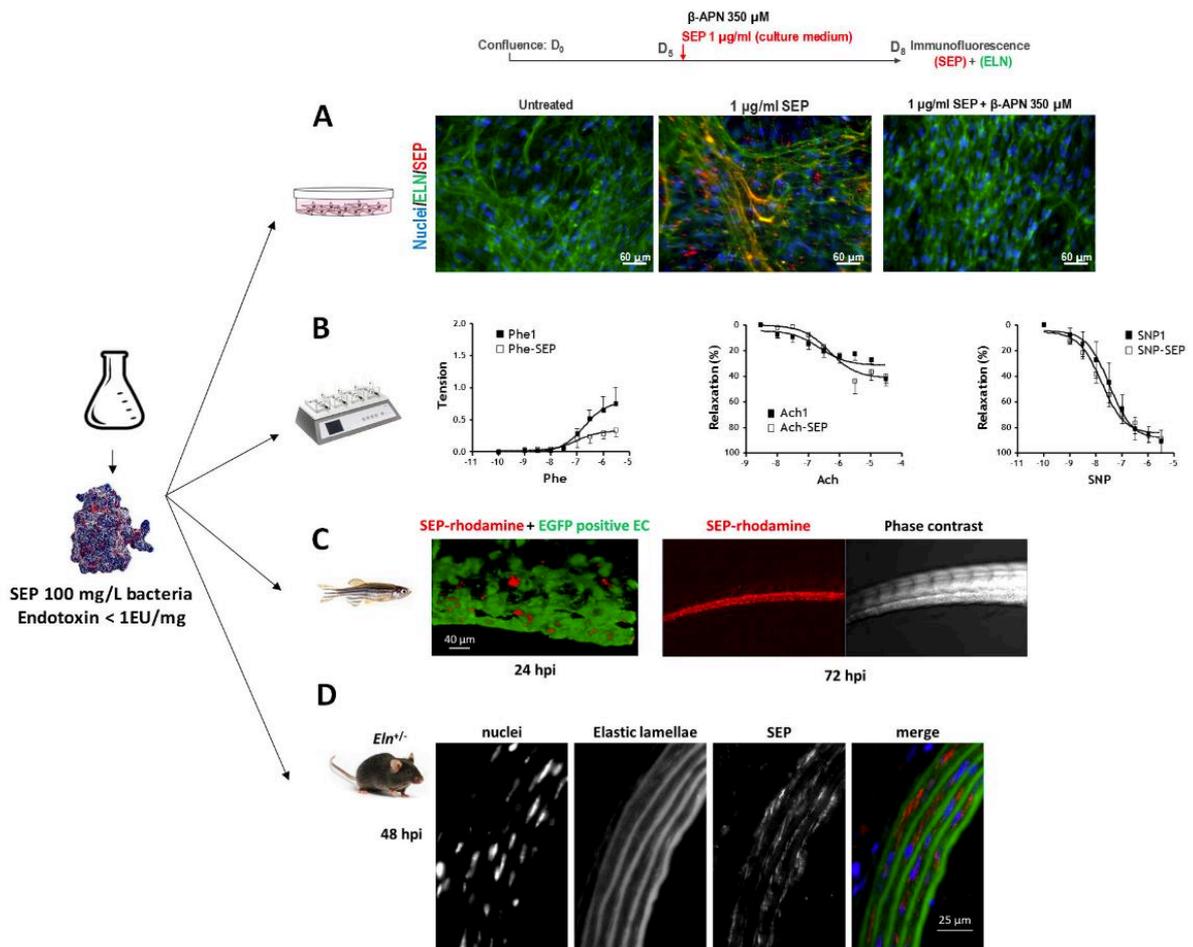
Concernant ses caractéristiques physico-chimiques, la SEP a un poids moléculaire de 56 kDa et un point isoélectrique basique (10,31) très proche de celui de la tropoélastine humaine (10,4).



**Figure 56 - A) Séquence primaire de la SEP. B) Protocole résumé de la production de SEP. C) Caractérisation thermique du profil de coacervation en utilisant une solution de SEP à 1 mg/ml dans du PBS (pH 7.4) dans la gamme de température 20-60°C.**

## 5.2 Résultats préliminaires

Afin de s'assurer de la localisation et des effets biologiques de la SEP dans les tissus ou animaux traités, différentes expérimentations préliminaires ont été menées. Premièrement, afin d'évaluer sa capacité à s'intégrer à un réseau de fibres élastiques, la SEP a été couplée à un colorant fluorescent (la rhodamine) et 1 µg/mL de SEP a été ajoutée au milieu de culture de fibroblastes dermiques. Cette expérimentation a montré que la SEP (jaune) colocalise avec les dépôts fibrillaires de tropoélastine (vert) (Figure 57 A). De plus, l'intégration de la SEP aux matériaux élastiques est médiée par la lysyl oxydase puisque, lorsque cette dernière est inhibée par du β-aminopropionitrile, la SEP n'est pas en capacité d'intégrer/de colocaliser avec les dépôts de tropoélastine (Figure 57 A).



canal de Cuvier d'embryons de poisson zèbre *Tg(fli1a::EGFP)/Casper* de 48hpf et la localisation de la SEP (rouge) a été analysée dans l'organisme entier à 24h et 72h post injection (le focus sur la vascularisation du tronc est montré). D) Incorporation de la SEP dans le système vasculaire des souris déficientes en élastine. Marquage des artères par immunofluorescence des artères en utilisant l'anticorps anti-Flag (rouge). Les lames élastiques sont observées par auto-fluorescence de l'élastine (vert) et les noyaux ont été contre-colorés avec du DAPI (bleu). Barres d'échelle = 25  $\mu$ m

L'effet de la SEP sur la vasomotricité a été évalué par approche pharmacologique à l'aide d'un dispositif de myographie de tension. Des aortes de souris saines (C57BL/6) ont été montées sur le dispositif de myographie et soumises à 3 agents pharmacologiques : la phényléphrine (Phe) pour induire une contraction des CMLVs, l'acétylcholine (Ach) pour induire une relaxation dépendante de l'endothélium et le donneur de NO nitroprussiate de sodium (SNP, qui agit directement sur les CMLVs) pour induire une relaxation indépendante de l'endothélium afin d'établir le profil vasomoteur des aortes. Les vaisseaux ont ensuite été mis en contact de la SEP en suspension dans le milieu durant 1h. Une évaluation de l'effet du temps a été réalisée et n'a montré aucun changement dans la réactivité des vaisseaux entre les vaisseaux traités immédiatement par les agents pharmacologiques et ceux qui ont été maintenus 1h dans le milieu (données non montrées). Pour autant, après un contact d'une heure avec la SEP, il est observé une diminution de la contraction en réponse à la Phe, et aucun effet sur la relaxation induite par l'Ach ou le SNP (Figure 57 B). Ceci suggère que la SEP possède un effet de signalisation moléculaire sur les CMLVs, indépendamment d'une possible contribution mécanique élastique.

Dans le but d'évaluer la capacité de la SEP à induire un attachement cellulaire via ses motifs C-terminal GRKRK et du motif VGVAPG de la SEP, connus respectivement pour se lier à l'intégrine  $\alpha\beta3$  et l'EBP, l'adhérence de cellules dermiques humaines sur un gel à 10  $\mu$ g/ml de SEP a été testée en présence ou en l'absence de 20  $\mu$ g/ml d'un anticorps anti-intégrine  $\alpha\beta3$  et/ou de 3,6 mg/ml de L-lactose (inhibiteur de la fixation du ligand sur l'EBP) (Figure 58).

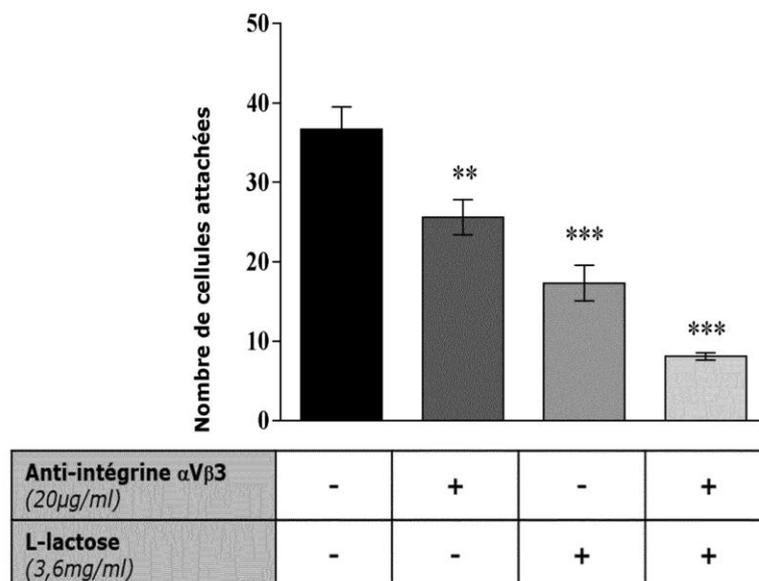
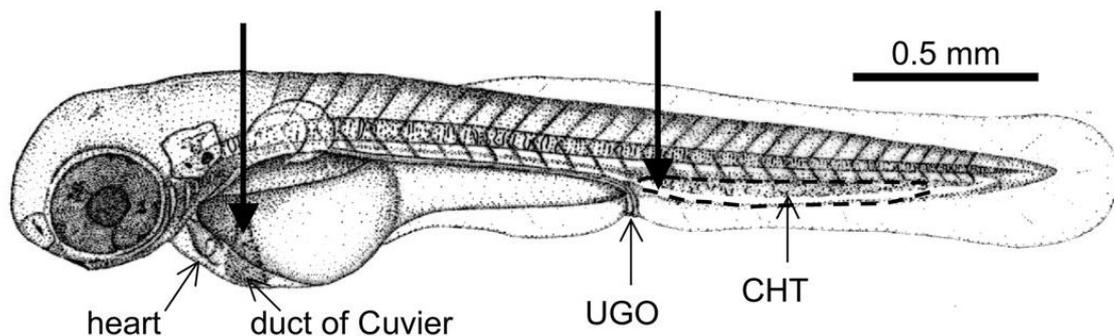


Figure 58 - Étude de l'adhérence cellulaire de la SEP. Les résultats présentés sont les moyennes de 4 réplicats  $\pm$  SEM. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (one-way ANOVA, suivi d'un post-test Bonferroni) (DEBRET et al. 2017)

En présence d'anticorps anti-intégrine  $\alpha\beta3$  seul, l'adhérence des cellules est inhibée de 30% tandis que la supplémentation du milieu de culture en L-lactose induit une inhibition de l'adhérence de 50%. Enfin, l'effet cumulé des deux inhibiteurs au milieu de culture provoque une diminution de l'adhérence de 78%.

Des tests ont également été réalisés sur des embryons de poisson zèbre (zebra fish) Tg(fli1a::EGFP)/Casper, afin d'évaluer la capacité de la SEP à s'extraire de la circulation sanguine pour intégrer la paroi artérielle. L'intérêt de ce modèle de zebra fish est sa transparence, ce qui permet de facilement identifier les organes d'intérêt. La SEP fluorescente a été injectée (injection unique) dans le canal de cuvier (Figure 59) de poisson zèbres 48h post fertilisation puis analysés par microscopie confocale à fluorescence à 24h et 72h post-injection. La vascularisation est facilement observable par détection des cellules endothéliales par l'EGFP. Ainsi, de façon très intéressante, il a été observé 24h après l'injection une accumulation de SEP dans la paroi des vaisseaux principaux (veine cardinale et aorte dorsale) (Figure 57C). De plus, cette accumulation de SEP est augmentée 72h après l'injection, ce qui indique qu'une partie de la SEP injectée reste dans le flux sanguin pendant au moins 3 jours et n'est pas directement éliminée par le foie ou les reins. De façon très intéressante, lorsque les vaisseaux ont été observés à un plus fort grossissement, de la SEP a pu être observée au-delà des cellules endothéliales, dans la paroi.



**Figure 59 - Anatomie d'un zebra fish**

Enfin, une expérimentation a été menée sur modèle murin afin de vérifier si, à l'instar du poisson zèbre, la SEP est capable de sortir de la circulation sanguine pour intégrer la paroi artérielle sur un modèle de mammifère. Ainsi, il a ainsi été réalisé une injection de SEP dans la veine caudal de souris déficientes génétiquement en élastine ( $Eln^{+/-}$ ). Puis, 48h après l'injection, l'aorte des animaux est prélevée et analysée par un marquage en immunofluorescence en utilisant l'anticorps anti-flag (rouge) (Figure 57D). Les lames élastiques sont observées par auto-fluorescence de l'élastine (vert) et les noyaux ont été colorés avec du DAPI (bleu) (Figure 57D). Comme observé dans le modèle de poisson zèbre, les résultats ont montré une accumulation de SEP dans la paroi artérielle des souris dans les différentes couches prouvant que la protéine synthétique serait capable de traverser la barrière endothéliale. Après deux jours, la SEP reste localisée avec les CMLVs. Toutefois, il n'est pas possible à ce niveau de précision de savoir précisément ce qu'il advient de la SEP, ne fait-elle que colocaliser entre les lames élastiques ? S'intègre-t-elle au sein des fibres élastiques existantes ? Toutefois, des expérimentations plus récentes réalisées au cours de ma thèse remettent en question ces résultats observés chez la souris (voir chapitre 6 de la discussion générale).

L'ensemble de ces résultats montre que la SEP semble donc être un élément très prometteur, Il s'agit désormais de tester ses propriétés mécaniques *in vivo* notamment dans le cadre de différentes pathologies affectant les fibres élastiques, ce qui fait l'objet de cette thèse.

### 5.3 Objectifs de la thèse

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet ANR Arterylastic (n° ANR-18-CE18-0001), qui a pour objectif d'évaluer le potentiel thérapeutique de la protéine élastique synthétique SEP sur les altérations des fibres élastiques survenant au cours du vieillissement, de l'hypoxie intermittente ou de l'hémizygotie pour le gène de l'élastine. L'objectif de cette thèse a été d'étudier le bénéfice du traitement par la SEP sur les artères dans trois modèles de souris présentant une déficience artérielle des fibres élastiques, à savoir : un modèle de déficience génétique des fibres élastiques, un modèle d'hypoxie intermittente et un modèle de vieillissement.

Dans cette thèse, de façon opérationnelle, le but des expérimentations a été d'évaluer l'impact du traitement par la SEP injectée par voie sanguine : sa capacité à pénétrer dans les parois artérielles et à s'intégrer dans les fibres élastiques altérées, sa capacité à signaler dans les cellules vasculaires pour remodeler la paroi artérielle et, *in fine*, à améliorer l'élasticité artérielle et la fonction cardiovasculaire. L'effet de la SEP a été évalué par la mesure de l'évolution, après traitement, des paramètres physiologiques des souris, de la structure artérielle, de la réactivité et du comportement mécanique de segments d'artères, ainsi que sur ses capacités à relancer la production de tropoélastine et plus généralement d'éléments impliqués dans la synthèse des fibres élastiques.

Cette étude a été divisée en quatre axes expérimentaux représentatifs des modèles pathologiques étudiés composants 28 groupes d'animaux (Figure 60).

- Un premier axe s'intéressant à l'effet de la SEP sur des souris hétérozygotes pour le gène de l'élastine (*Eln*) ou témoin, réparties dans 8 groupes d'animaux âgés de 6 mois : *Eln*<sup>+/+</sup> ou *Eln*<sup>+/-</sup>, mâles ou femelles, traités par la SEP (groupe SEP) ou injectés avec une solution de NaCl (groupe témoin).
- Un second axe s'intéressant à l'effet de la SEP sur des souris C57Bl6/J ayant subi une période d'hypoxie intermittente ou normoxiques, réparties dans 8 groupes d'animaux âgés de 6 mois : exposés à l'hypoxie intermittente (HI) pendant 14 jours ou leurs témoins normoxiques (N), mâles ou femelles, traités par la SEP (groupe SEP) ou injectés avec une solution de NaCl (groupe témoin),
- Un troisième axe s'intéressant à l'effet de la SEP sur des souris C57Bl6/J âgées de 24 mois (vieillesse), réparties dans 4 groupes d'animaux composé d'individus mâles ou femelles, traités par la SEP (groupe SEP) ou injectés avec une solution de NaCl (groupe témoin),

- Enfin, un dernier axe combinant deux des conditions d'altération des fibres élastiques étudié, avec l'étude de l'effet de la SEP sur des animaux âgés de 24 mois et hémizygotes pour le gène de l'élastine, réparties dans 8 groupes d'animaux composés de souris mâles ou femelles, *Eln*<sup>+/+</sup> ou *Eln*<sup>+/-</sup>, traités par la SEP (groupe SEP) ou injectés avec une solution de NaCl (groupe témoin).

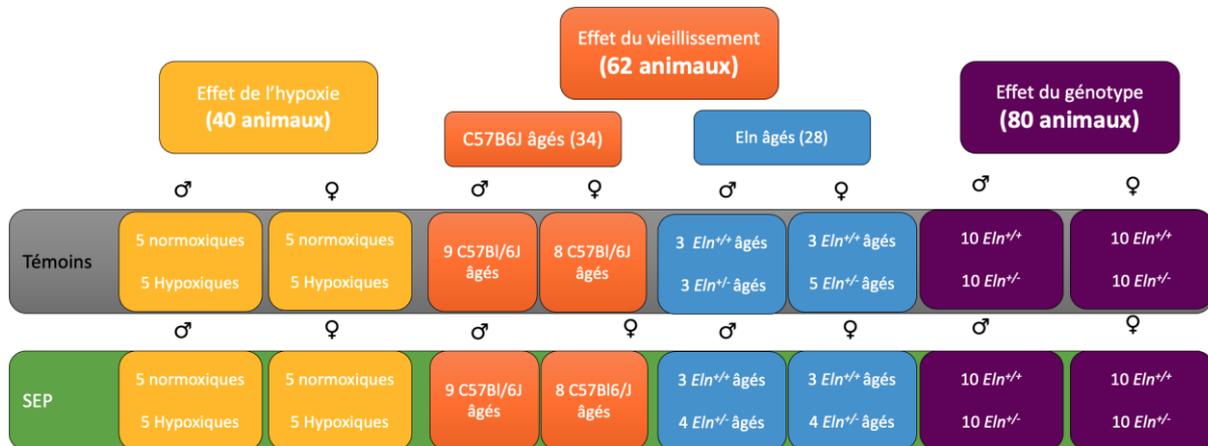


Figure 60 - Répartition des groupes en fonction des modèles pathologiques

Les animaux traités ou témoins ont été étudiés à l'aide des différentes techniques prévues dans un ordre séquentiel précis afin de pouvoir réaliser toutes les études sur tous les animaux et ainsi minimiser le nombre d'animaux utilisés :

- En premier lieu, les études *in vivo* (Mesure de la pression artérielle par sphymomanomètre à la queue (tail-cuff) sur animal éveillé,
- Puis les études *ex vivo* sur organes isolés (mesure de la mécanique et de la réactivité artérielles par artériographie de pression sur 3 artères d'intérêts : Aorte Ascendante, artère pulmonaire et artère fémorale),
- Les études *in vitro* en primo-culture de CMLVs aortiques, pour la mesure de la prolifération (MTT) et de la production d'élastine (ELISA),
- Les études histologiques de la structure et de la composition des artères,
- Les études biochimiques sur des extraits de tissus prélevés afin de quantifier l'expression de l'élastine, de la fibrilline-1 et des principaux éléments impliqués dans la synthèse des fibres élastiques (western blot, qPCR).

Les résultats obtenus montrent un potentiel intéressant de la SEP particulièrement dans le traitement de la déficience génétique en élastine ayant fait l'objet d'un premier article sur la SEP (voir article 1) notamment en réduisant le module incrémental d'élasticité correspondant à la rigidité artérielle et rétablissant la fonction endothéliale altérée des animaux *Eln*<sup>+/-</sup>. La SEP présente également un potentiel intéressant dans le traitement de la rigidité artérielle induite par l'hypoxie intermittente (voir chapitre 2 des résultats).

## **Matériel & méthodes**

## Modèles animaux

Les expérimentations ont été réalisées sur différentes souches de souris correspondant aux différentes causes d'endommagement des fibres élastiques étudiées :

- Des souris C57Bl/6J adultes ou âgées provenant de la société Charles River (Saint-Germain Nuelles, France),
- Des souris haploinsuffisantes pour le gène de l'élastine ( $Eln^{+/+}$  et  $Eln^{+/-}$ ) issues de notre élevage à la Plateforme de Haute Technologie Animalière (PHTA) (La Tronche, France),

L'ensemble des animaux ont été stabulés dans l'animalerie du laboratoire HP2, avec une alternance jour/nuit de 12h/12h de 8h à 20h, une température de 20-22°C, et disposaient de nourriture et d'eau *ad libitum*. L'ensemble des animaux ont bénéficié d'un minimum d'une semaine de stabulation dans notre animalerie avant d'être inclus dans les différents protocoles expérimentaux.

Les études présentées dans ce manuscrit ont été menées conformément aux pratiques recommandées par la Convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques (*conseil de l'Europe, série des traités européens n°123, Strasbourg 18 mars 1986*). Les différents projets ont été approuvés par le Comité d'éthique sur l'expérimentation animale de l'université Grenoble Alpes (n° d'autorisations : APAFIS#20023-2019032809004121) et ont obtenu une autorisation du Ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation (n° d'autorisation : APAFIS#20023-2019032809004121 v2).

### 1.1 Modèle de déficience génétique en élastine

La création de la lignée de souris génétiquement déficientes en élastine a été réalisée à la fin des années 1990 par l'équipe des Drs Keating et Li (Université de l'Utah, Salt Lake City, Utah, USA), en collaboration avec l'équipe du Pr Mecham (Washington University, Saint Louis, Missouri, USA) (D. Y. Li, Brooke, et al. 1998).

Un vecteur cible a été réalisé dans le but d'éliminer par recombinaison homologue le promoteur et l'exon 1 du gène de l'élastine, permettant l'obtention d'une mutation nulle de l'un des deux allèles du gène de l'élastine aboutissant à la génération d'animaux hétérozygotes. Le vecteur a été introduit par électroporation dans des cellules souches embryonnaires R1 (dérivées d'un croisement des souches 129/SV et 129/SVJ) et les cellules recombinantes ont été isolées par sélection positive/négative (D. Y. Li, Brooke, et al. 1998). Issus de la digestion par l'enzyme de restriction Xba1, les fragments d'ADN ont été analysés par Southern Blot, les fragments de 9 Kb correspondent aux fragments sauvages tandis que ceux de 6 Kb correspondent aux fragments recombinants (Figure 61). Les cellules possédant les fragments recombinants de 6 kb sont ensuite injectées dans des blastocystes C57Bl/6J ultérieurement implantés dans des femelles C57Bl/6J pseudo-gestantes aboutissant à la formation d'animaux  $Eln^{+/-}$ . Afin de se rapprocher le plus possible du génotype C57Bl/6J, ces animaux ont par la suite subi des croisements successifs avec des souris C57Bl/6J pendant plusieurs

génération aboutissant à une analogie génotypique de 98%. Il est également possible de croiser entre-eux des mâles et des femelles  $Eln^{+/-}$  afin de générer des souris  $Eln^{-/-}$ .

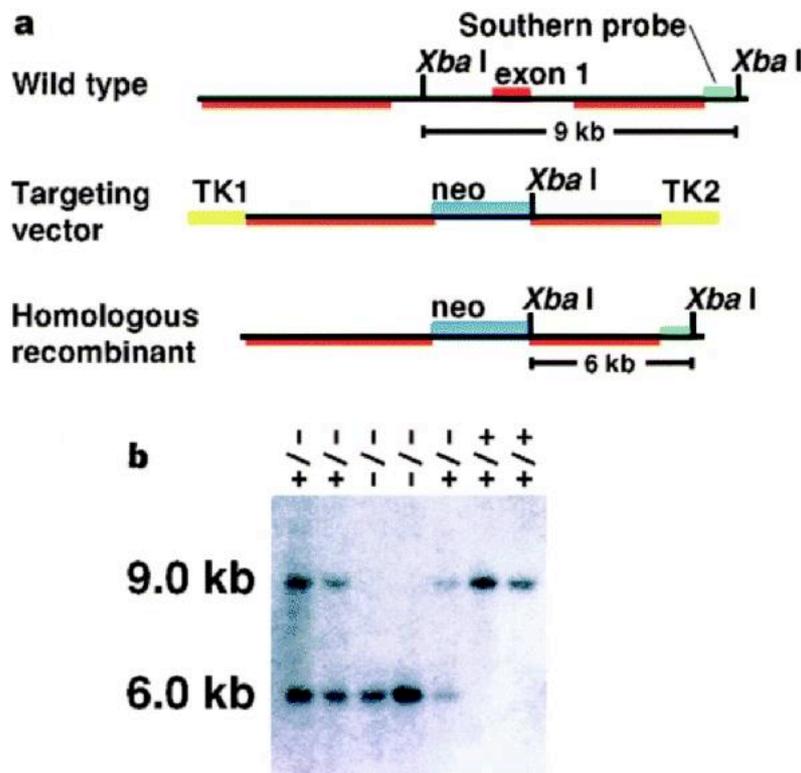


Figure 61 – A) Schéma du vecteur de ciblage conçu pour supprimer le promoteur et l'exon 1 du gène *Eln* chez la souris. TK, thymidine kinase. B) analyse par Southern Blot de l'ADN de la queue, digéré avec *Xba*I, de souris  $ELN^{+/+}$ ,  $ELN^{+/-}$ , et  $ELN^{-/-}$ . Les fragments de 9 kb de type sauvage et de 6 kb ciblés par *Xba*I ont été identifiés en utilisant une sonde en dehors de la région 3' d'homologie. (D. Y. Li, Brooke, et al. 1998)

L'étude de l'impact de la SEP sur la déficience génétique en élastine a porté sur 8 groupes d'animaux. 120 souris mâles et femelles âgées d'environ 6 mois (5 à 7 mois)  $Eln^{+/+}$  et  $Eln^{+/-}$  qui sont soit traitées avec une solution de SEP (groupes SEP) soit injectées avec une solution de NaCl (groupes témoins). 80 animaux ont été nécessaires à la réalisation de l'artériographie de pression, les western blot, la qPCR, la mesure du poids des cœurs auxquels s'ajoutent 40 animaux pour la mesure invasive de la pression artérielle et la mesure de l'onde de pouls. 80 animaux supplémentaires ont été générés et élevés puis envoyés au LBTI à Lyon pour pouvoir réaliser les études de réactivité vasculaire et d'histologie.

## 1.2 Modèle de vieillissement

Nos travaux ont porté sur 4 groupes d'animaux âgés. 34 souris mâles et femelles âgées d'environ 24 mois (23 à 28 mois) C57Bl/6J qui sont soit traitées avec une solution de SEP (groupes SEP) soit injectées avec une solution de NaCl (groupes témoins) ont été nécessaires à la réalisation de l'artériographie de pression, des western blot, de la qPCR et de la mesure du poids des cœurs. 34 animaux supplémentaires ont été envoyés au LBTI à Lyon pour pouvoir réaliser les études de réactivité vasculaire et d'histologie.

Nous avons également pu travailler et tester l'efficacité du traitement sur un modèle mixte combinant deux des conditions d'altération des fibres élastiques étudiées : les animaux âgés génétiquement déficients en élastine (*Eln*<sup>+/-</sup>). Nos travaux ont porté sur 8 groupes d'animaux. 28 souris mâles et femelles âgées d'environ 24 mois (23 à 28 mois) *Eln*<sup>+/+</sup> et *Eln*<sup>+/-</sup> qui sont soit traitées avec une solution des SEP (groupe SEP) soit injectées avec une solution de NaCl (groupes témoins) ont été nécessaires à la réalisation de l'artériographie de pression, des western blot, de la qPCR et de la mesure du poids des cœurs.

### 1.3 Modèle d'exposition à l'hypoxie intermittente

Nos travaux ont porté sur 8 groupes d'animaux de souris C57Bl/6J comportant au total 85 souris mâles et femelles, traitées avec une solution de SEP (groupes SEP) ou injectées avec une solution de NaCl (groupes témoins) âgées d'environ 6 mois (5 à 7 mois) exposées à des flux de gaz induisant une hypoxie intermittente (groupes hypoxiques) ou à un contrôle d'exposition à un flux de gaz identique sans la valence hypoxique (groupes normoxiques). 45 animaux ont été nécessaires à la réalisation de l'artériographie de pression, des western blot, de la qPCR et de la mesure du poids des cœurs auxquels s'ajoutent 40 animaux pour la mesure invasive de la pression artérielle et la mesure de l'onde de pouls. 80 animaux supplémentaires seront envoyés au LBTI à Lyon dans le cadre du projet ANR Arterylastic dans l'année à venir pour pouvoir réaliser les études de réactivité vasculaire et d'histologie.

Les animaux sont placés durant 2 semaines (14 jours) dans le dispositif d'hypoxie intermittente développé par notre laboratoire. Ce dispositif permet d'induire dans les cages des animaux des variations cycliques de la fraction inspirée en oxygène ( $FiO_2$ , alternant entre 21% et 5%), induisant donc des cycles de désaturation artérielle en  $O_2$  de l'ordre de 60% puis de re-saturation toutes les minutes alternant 30 secondes d'injection d'azote puis 30 secondes d'injection d'air (Figure 62). Les paramètres de l'hypoxie intermittente sont contrôlés par la programmation du temps et du pourcentage d'ouverture d'électrovannes. Ainsi, des quantités précises d'azote sont injectées, ce qui permet de chasser l' $O_2$  des cages jusqu'à atteindre une  $FiO_2$  pendant la période d'hypoxie du cycle fixée à l'avance. Dans le cadre de notre protocole, la  $FiO_2$  pendant la période d'hypoxie du cycle est fixée à 5%. Ensuite, de l'air est injecté afin de restaurer la normoxie ( $FiO_2=21\%$ ) sur la deuxième partie du cycle. Les animaux sont exposés aux flux de gaz 8 h par jour, durant leur période de sommeil (en journée). Les flux de gaz pouvant être par eux-mêmes des vecteurs de stress, les animaux témoins sont placés dans des cages similaires en tout point exceptés la composition du gaz (ces cages présentent des flux de gaz intermittents ainsi qu'une nuisance sonore identique). En effet, les cages normoxiques sont ventilées avec un flux temporel identique à celui des cages hypoxiques mais cette fois avec un flux intermittent d'air ( $FiO_2=21\%$ ). Les animaux passent 14 jours dans le dispositif, l'exposition aux flux de gaz (Azote pour les animaux en hypoxie intermittente ou air pour les animaux en normoxie) a lieu de 6h à 14h.



Figure 62 – Dispositif d'exposition à l'hypoxie intermittente

## 2 Administration de la SEP

Après la pesée des animaux, une injection unique de 100  $\mu$ l d'une solution de NaCl à 0,9% (groupes témoins) ou d'une solution de NaCl à 0,9% et de SEP (12  $\mu$ g/g de souris) est réalisée dans la veine caudale de chaque animal. La solution de NaCl ou de NaCl et de SEP (cette dernière sera nommée solution de SEP par la suite) est injectée trois jours avant les expérimentations menées sur les animaux. Un second protocole est étudié avec une triple injection de SEP sur 3 semaines, à raison d'une injection par semaine avec un prélèvement réalisé une semaine après la troisième et dernière injection. D'un point de vue pratique, la SEP étant un produit visqueux, la quantité nécessaire de SEP pour chaque animal (en fonction de son poids) est en premier lieu prélevée de son stock avant de compléter le volume à 100  $\mu$ l avec la solution de NaCl à 0,9%. Ceci a permis d'injecter un volume équivalent de solution entre tous les animaux témoins et les animaux traités avec la SEP. Les injections ont été réalisées en respectant les conditions d'asepsies rigoureuses nécessaires à une injection intraveineuse.

## 3 Anesthésie et prélèvements

A l'issue de l'expérimentation *in vivo*, soit 3 jours après l'injection de SEP ou de son témoin (NaCl), les animaux sont anesthésiés par injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine (100 mg/kg) et de xylazine (10mg/kg). Après s'être assuré de la parfaite anesthésie de l'animal, une injection d'héparine (1,7 UI/g) est alors réalisée au niveau de la veine saphène, afin d'empêcher la coagulation sanguine. Une laparotomie suivie d'une thoracotomie sont ensuite réalisées afin d'accéder aux organes et vaisseaux sanguins d'intérêt. Dans un premier temps, un échantillon sanguin est prélevé pour réaliser l'hématocrite, dans un deuxième temps, les organes et vaisseaux d'intérêts sont rapidement prélevés, sous loupe binoculaire et placés dans du liquide physiologique (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,6 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,17 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,6 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5,5 mM D-glucose, 0,025 mM EDTA et 10 mM HEPES) pour la réalisation d'analyses *ex vivo* ultérieures (artériographie de pression). Enfin, les organes d'intérêts sont stockés à -20°C (artères carotides, poumons, cœurs, crosse aortique) ou -80°C (reins, foies, aortes thoraciques,

aortes abdominales) pour la réalisation d'analyses *in vitro* (analyses biochimiques et biologie moléculaire) et/ou *in vitro* (culture cellulaires).

## 4 Évaluation des paramètres hémodynamiques

Plusieurs méthodologies ont été utilisées pour mesurer la pression artérielle des souris : la pléthysmographie (méthode non invasive) et le cathétérisme carotidien et fémorale (méthode invasive). Cependant, la pléthysmographie ayant révélé un fort manque de fiabilité dans la mesure des pressions artérielles, les résultats ne sont pas exploitables et ne sont donc pas présentés dans ce manuscrit ; ce qui l'ampute d'une partie de l'analyse des effets *in vivo* de la SEP, principalement focalisée sur l'analyse de l'évolution de la pression artérielle dans les 3 jours suivant l'injection. Le reste de cette étude *in vivo* étant la surveillance de la bonne tolérance des animaux après injection à la SEP avec un suivi du poids et du comportement des animaux dans les 3 jours suivant l'injection.

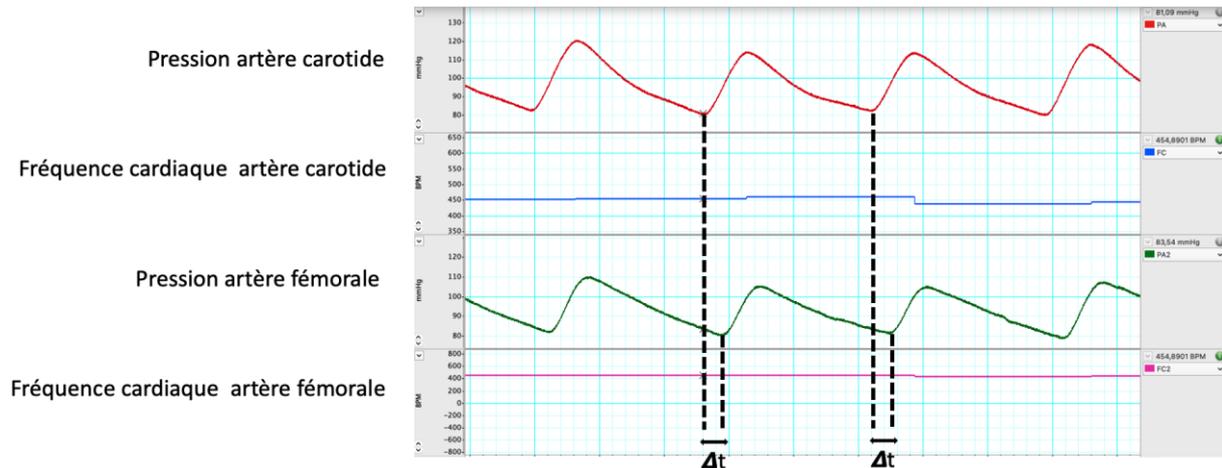
### 4.1 Mesure de la pression artérielle par cathétérisme de la carotide

La mesure de la pression artérielle par méthode invasive nous permet d'avoir une vision de l'impact de la SEP sur cette variable physiologique, 3 jours après son administration. Les souris sont placées dans une chambre isolée où elles sont anesthésiées par inhalation d'isoflurane à 2,5-3,5%, dispensé à l'aide d'un vaporisateur (#34-1040, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Lorsqu'elles sont endormies, les souris sont ensuite placées sur une table chauffante thermostatée, permettant de maintenir leur température corporelle autour de 37 °C, sous une concentration d'isoflurane de 1-1,5% administrée par un cône nasal. La concentration d'isoflurane est adaptée afin de conserver une fréquence cardiaque d'environ 400-450 battements par minutes. Un cathéter en polyéthylène de 0,4mm rempli d'une solution saline héparinée, connecté à une sonde de pression et à un système d'acquisition (Powerlab 26T, AD instrument, Dunedin, Nouvelle-Zélande) et à un logiciel d'acquisition (Labchart, AD instrument, Dunedin, Nouvelle-Zélande) est inséré dans la carotide gauche. Le capteur de pression auquel est relié le cathéter permet d'enregistrer les pressions artérielles systolique, diastolique et moyenne ainsi que la fréquence cardiaque pendant une période de temps durant laquelle le signal est stable (2-5 min).

### 4.2 Mesure de la vitesse d'onde de pouls

Après acquisition du signal de pression artérielle par cathétérisme de l'artère carotide gauche, l'artère fémorale gauche est dégagée afin d'y introduire un second cathéter en polyéthylène de 0,4mm afin de réaliser l'enregistrement de la pression artérielle à ce niveau en parallèle de l'enregistrement de la pression carotidienne. Ce deuxième cathéter est lui-aussi rempli d'une solution saline héparinée, lui-même connecté à une seconde sonde de pression et au système d'acquisition (Powerlab 26T, AD instrument, Dunedin, Nouvelle-Zélande) et du logiciel d'acquisition (Labchart, AD instrument, Dunedin, Nouvelle-Zélande). Le décalage de temps ( $\Delta t$ ) mesuré entre les pieds d'onde du signal de pression carotidien et du signal de pression fémorale correspond au

temps que met l'onde de pouls pour parcourir la distance (L) entre les deux cathéters (distance mesurée *in situ* manuellement après sacrifice de l'animal). La vitesse d'onde de pouls (VOP), un indicateur de la rigidité des parois artérielles puisqu'elle est d'autant plus élevée que les parois artérielles sont rigides, est alors calculée comme étant le rapport  $L / \Delta t$ .

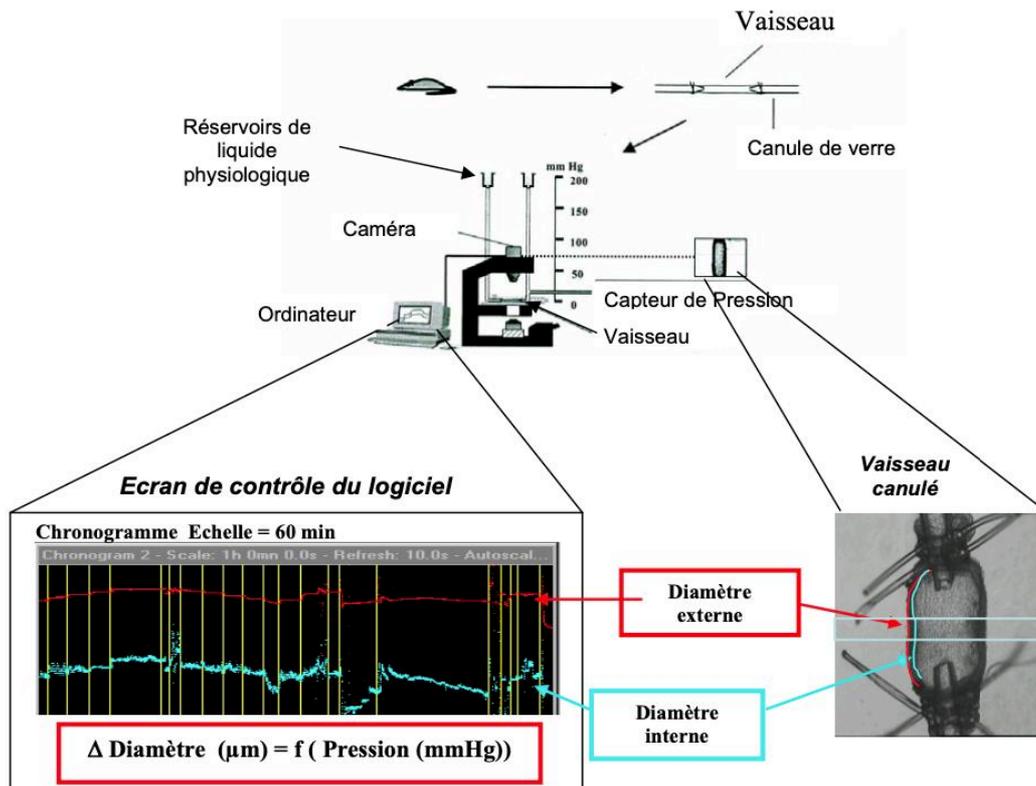


## 5 Mécanique vasculaire

### 5.1 Dissection et canulation des vaisseaux sanguins

Les vaisseaux sanguins récoltés (aorte ascendante, artère fémorale et artère pulmonaire gauche) au cours du prélèvement sur les souris sont conservés à 4°C dans du liquide physiologique (voir paragraphe 3). Les éventuelles adhérences de tissus conjonctifs et/ou de graisse n'ayant pas pu être ôtées lors du prélèvement initial sont finement reséquées sous loupe binoculaire afin d'obtenir un vaisseau sanguin le plus intègre possible et sans tissus non-vasculaires. En effet, la présence d'excroissance graisseuse ou conjonctive pourra par la suite provoquer des erreurs dans la détection de l'évolution des diamètres externes au cours de l'expérimentation, de plus d'éventuelles cellules graisseuses pourraient produire des agents modifiant la réactivité des cellules vasculaires. Le vaisseau est ensuite placé dans un bain de liquide physiologique chauffé puis monté sous loupe binoculaire sur un dispositif d'artériographie de pression, composé de deux canules en verres adaptées pour recevoir les différents segments de vaisseaux (4 à 8 mm de longueur). Les canules utilisées pour y monter les aortes ascendantes ont un diamètre d'environ 1mm et sont utilisées en l'état, avec seulement un rodage de leurs extrémités à la flamme, afin d'en arrondir les bords pour qu'ils ne soient plus tranchants et de ne pas risquer de coupure du vaisseau lors du montage de celui-ci. Les extrémités des canules utilisées pour y monter les artères pulmonaires ou les artères fémorales sont préalablement étirées à l'aide d'une étireuse de canules afin d'en diminuer le diamètre et de permettre le montage de ces vaisseaux sanguins de diamètre plus faible que celui de l'aorte ascendante. Une fois placées sur les canules, les artères d'intérêt sont ligaturées à

l'aide de fils de nylon fin dans le but d'assurer l'étanchéité intra luminale et de maintenir les artères en place. Les canules sont reliées par des tubes en silicone à deux réservoirs contenant du liquide physiologique dont la hauteur par rapport au sol peut varier. La pression intraluminale est fonction de la hauteur de colonne d'eau et peut être modulée en déplaçant les réservoirs de liquide physiologique verticalement (Figure 64).



**Figure 64 - Dispositif et procédure d'artériographie de pression**

Le dispositif d'artériographie de pression est ensuite déplacé sur un microscope inversé (Olympus), équipé d'une caméra (SONY) reliée à un ordinateur permettant l'enregistrement en continu de l'évolution du diamètre artériel. Les programmes informatiques permettant la détection automatique et l'enregistrement des diamètres vasculaires (Windiam) ainsi que l'analyse des enregistrements des diamètres (Diamstat) ont été développés au laboratoire et permettent une mesure précise et continue de l'évolution des diamètres externes au cours du temps en fonction de la pression imposée aux vaisseaux. Les diamètres internes sont eux mesurés à haute pression par transillumination, puis calculées pour les basses pressions afin de couvrir toute la gamme de pression utilisée. Ainsi, il est possible de soumettre les vaisseaux d'intérêts à un protocole précis de variation de pression intraluminale (pression hydrostatique) appliqué de façon incrémentielle et croissante, différent en fonction du vaisseau étudié (voir chapitre 5.2).

## 5.2 Artériographie de pression : Mesure des diamètres artériels en fonction de la pression intraluminale

Les mesures de l'évolution des diamètres artérielles sont réalisées suivant un protocole précis. Premièrement, 3 cycles de montée en pression de quelques secondes chacun (de bas en haut de la gamme de pression du vaisseau concerné) sont réalisés afin de préconditionner le vaisseau et de libérer d'éventuelles adhérences liées au maintien des vaisseaux hors pression dans du liquide physiologique. Dans un second temps, l'étanchéité du vaisseau est vérifiée et corrigée si nécessaire, pour cela, on applique une pression constante, équivalente à une pression physiologique moyenne, au vaisseau (75 mmHg pour les artères systémiques, 25 mmHg pour l'artère pulmonaire) puis on coupe le flux de liquide physiologique en s'assurant que le diamètre sous pression du vaisseau étudié ne réduit pas. En effet, il est possible lors de la canulation ou du prélèvement d'avoir endommagé le vaisseau, d'avoir prélevé une bifurcation ou encore de ne pas avoir serré les fils de nylon de façon suffisante. Si une fuite est repérée, les ligatures sont resserrées et, si cela corrige la fuite, l'expérience se poursuit. Si cela ne corrige pas la fuite, un trou dans la paroi du vaisseau est recherché et dans ce cas, le vaisseau est abandonné. Une phase de 30 minutes d'équilibration est ensuite effectuée à faible pression permettant au vaisseau de progressivement atteindre une température physiologique de 37°C. Le protocole d'augmentation progressive de la pression intraluminale, avec enregistrement du diamètre du vaisseau, peut ensuite démarrer. La gamme de pression s'étale de 0 à 175 mmHg pour l'aorte, de 0 à 150 mmHg pour l'artère fémorale et de 2 à 50 mmHg pour l'artère pulmonaire. Le vaisseau est maintenu 5 minutes à chaque palier de pression de façon incrémentale et dépendante du type de vaisseau. L'incrément de pression est de 25 mmHg pour les artères systémiques (aorte et artère fémorale) et de 10 mmHg pour l'artère pulmonaire (ou 8 mmHg pour le premier incrément de 2 à 10 mmHg). Ces distinctions sont dues aux caractéristiques propres des vaisseaux : contrairement aux artères à paroi épaisses, les artères pulmonaires ont des parois très fines qui se collapsent à pression transmurale nulle, d'où une pression initiale de 2 mmHg, juste suffisante pour éviter le collapsus, susceptible d'endommager les cellules endothéliales, et pour que le vaisseau conserve une forme cylindrique nécessaire aux mesures. De plus, la pression artérielle physiologique pulmonaire est relativement faible ce qui explique que l'incrément de pression soit plus faible et que la gamme de pression s'arrête à 50 mmHg. Enfin, nous avons constaté de façon empirique que les artères fémorales subissaient des dommages très importants au-delà de 150 mmHg, cela explique donc que cette valeur maximale soit celle définie pour ces vaisseaux.

Les variations du diamètre externes sont donc enregistrées en continue via le logiciel Windiam qui nous permet ensuite d'extraire une valeur du diamètre moyenné sur plusieurs secondes à chaque pression (logiciel Diamstat). Concernant le diamètre interne, il est possible de la mesurer uniquement par trans-illumination du vaisseau (le bord interne ne devient visible que lorsqu'on augmente l'intensité lumineuse). Cette mesure est possible à chaque incrément de pression pour les artères pulmonaires, cependant, pour les artères systémiques, l'épaisseur de la paroi empêche une détection précise du diamètre interne par manque de contraste pour des pressions inférieures à 125 mmHg. Ainsi, la mesure du diamètre interne pour les artères systémiques n'est réalisée directement qu'aux pressions les plus hautes, alors qu'il est calculé pour les pressions plus basses afin de couvrir toute la gamme de pression.

Le diamètre interne aux basses pressions est calculé à partir des diamètres externes et internes mesurés aux pressions qui le permettent, et de l'aire de la section transversale de la paroi (ASTP) qui reste constante à tous les niveaux de pression du protocole comme cela a été précédemment décrit par notre laboratoire (G. Faury et al. 1999) ce qui permet d'obtenir par calcul une valeur précise du diamètre interne des artères à toutes les pressions.

L'ASTP est calculée à partir des diamètres externes ( $D_{ext}$ ) et interne ( $D_{int}$ ) directement mesurés à la pression maximale de la gamme de pression du vaisseau, selon l'équation suivante :

$$ASTP = (\pi/4) * (D_{ext}^2 - D_{int}^2)$$

Considérant que l'ASTP reste constante à tous les niveaux de pressions, la formule utilisée pour calculer le diamètre interne à une pression donnée (x mmHg) est donc la suivante :

$$D_{int\ x\ mmHg} = \sqrt{(D_{ext\ x\ mmHg}^2 - D_{ext\ max}^2 + D_{int\ max}^2)}$$

Ainsi, lorsque cela est nécessaire, le diamètre interne est calculé à partir de la valeur mesurée du diamètre externe à la pression correspondante et des mesures de diamètres internes et externes effectuées à la plus haute pression testée.

L'épaisseur de la paroi artérielle à une pression donnée (x mmHg) est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$e_{x\ mmHg} = \frac{(D_{ext\ x\ mmHg} - D_{int\ x\ mmHg})}{2}$$

## 5.3 Évaluation des propriétés mécaniques des vaisseaux

### 5.3.1 La distensibilité artérielle

La distensibilité d'une artère est définie comme un changement relatif de volume par unité de pression lors d'un petit incrément de pression intraluminaire (Smith et Kampine 1990). Nous évaluons la distensibilité plutôt que la compliance (Compliance =  $\Delta V / \Delta P$ , changement du volume absolu par unité de pression), en raison des éventuelles différences de diamètre initial (pression nulle) entre les vaisseaux des différents groupes, particulièrement en ce qui concerne les génotypes différents. En effet, il est reconnu que les souris  $Eln^{+/-}$  présentent un diamètre aortique plus faible que celui des  $Eln^{+/+}$  (Mylène Pezet et al. 2008b). Il est donc nécessaire d'évaluer des changements de volume relatifs, sans quoi, cela pourrait entraîner des comparaisons et interprétations erronées de la différence de volume absolu.

La distensibilité ( $D$ ) s'exprime de la manière suivante :

$$D = \frac{100 * (\Delta V / V_a)}{\Delta P}$$

$V_a$  : volume initial avant changement de pression  $\Delta P$

$\Delta V$  : variation de volume à la suite du changement de pression  $\Delta P$

$\Delta P$  : *incrément de pression* ( $P_b - P_a$ )

$a$  et  $b$  : *respectivement les niveaux de pression initial et final*

Comme le volume luminal du segment de vaisseau utilisé est défini par :

$$V = \frac{L * \pi * D_{int}^2}{4}$$

La distensibilité ( $D$ ) est alors égale à :

$$D = \frac{100 * (\Delta V / V_a)}{\Delta P}$$

*Soit*

$$D = \frac{100 * \left( \frac{L_b * \pi * D_{int_b}^2}{4} - \frac{L_a * \pi * D_{int_a}^2}{4} \right)}{P_b - P_a} \bigg/ \frac{L_a * \pi * D_{int_a}^2}{4}$$

Au cours d'une expérimentation d'artériographie de pression, la longueur  $L$  du segment artériel étant constante car contrainte entre les deux canules ( $L_a = L_b$ ) alors la formule peut se simplifier comme suit :

$$D = \frac{100 * \left( (D_{int_b}^2 - D_{int_a}^2) / D_{int_a}^2 \right)}{P_b - P_a}$$

Au cours de l'expérimentation, les incréments de pression sont de 25 mmHg, la distensibilité est donc exprimée en fonction de cet incrément entre une pression  $x$  mmHg et une pression  $x+25$  mmHg ( $D_{25}$ ) :

$$D_{25} = 100 * \left( (D_{int_{x+25}}^2 - D_{int_x}^2) / D_{int_x}^2 \right)$$

### 5.3.2 Le stress circonférentiel de la paroi

Le stress ( $\sigma$ , exprimé en kPa) représente les contraintes mécaniques (forces) circonférentielles subies par unité d'épaisseur de la paroi et est calculé à partir de la formule donnée par Gibbons et Shadwick (Gibbons et Shadwick 1989) :

$$\sigma = \frac{P * r}{e}$$

$P$  : *pression (en kPa)*

$r$  : *rayon interne*  $\left( \frac{\text{diamètre interne}}{2} \right)$  *en  $\mu m$*

$e$  : *épaisseur de la paroi en  $\mu m$*

1 kPa = 7,5006 mmHg

### 5.3.3 L'étirement circonférentiel de la paroi

Lors de la mise sous pression, la paroi artérielle subit une déformation qui peut être décrite en termes d'étirement circonférentiel correspondant au rapport de la variation du diamètre moyen du vaisseau (= diamètre au milieu de la paroi) par rapport à sa valeur d'origine, à l'état non soumis à un stress. Cet étirement circonférentiel du diamètre de milieu de paroi ( $\epsilon$ , en anglais mid-wall strain) est calculé comme suit (Gibbons et Shadwick 1989) :

$$\epsilon_{p_x \text{ mmHg}} = \frac{1 - \left( \frac{D_{ext p_x \text{ mmHg}} + D_{int p_x \text{ mmHg}}}{2} \right)}{\left( \frac{D_{ext p_0 \text{ mmHg}} + D_{int p_0 \text{ mmHg}}}{2} \right)}$$

D'où :

$$\epsilon_{p_x \text{ mmHg}} = \frac{1 - (D_{ext p_x \text{ mmHg}} + D_{int p_x \text{ mmHg}})}{(D_{ext p_0 \text{ mmHg}} + D_{int p_0 \text{ mmHg}})}$$

$D_{ext/int p_x \text{ mmHg}}$  : diamètre (externe/interne) à une pression donnée

$D_{ext/int p_0 \text{ mmHg}}$  : diamètre (externe/interne) à pression nulle

### 5.3.4 Le module incrémental d'élasticité

Le module incrémental d'élasticité ( $E_{inc}$ , exprimé en MPa) permet d'évaluer les propriétés élastiques intrinsèques d'un matériau, indépendamment de sa géométrie. Il correspond à la force qui devrait être appliquée au matériau pour engendrer une extension de 100% (force nécessaire pour faire doubler la taille à une pression donnée). Il correspond également à la pente de la relation du stress en fonction de l'étirement (Gibbons et Shadwick 1989):

$$E_{inc \Delta P} = 0.75 (1 + \epsilon) + \frac{\Delta \sigma}{\Delta \epsilon}$$

$E_{inc \Delta P}$  : module incrémental d'élasticité pour un incrément de pression donné sur la gamme de pression testée

$\Delta \sigma$  : variation du stress sur ce même incrément

$\Delta \epsilon$  : variation de l'étirement sur ce même incrément

## 5.4 Évaluation de la réactivité vasculaire

A l'issue de l'expérimentation, un test d'évaluation de l'intégrité des cellules vasculaires est réalisé par ajout de substances pharmacologiques vasoactives spécifiques des différentes cellules composant la paroi vasculaire. Ainsi, la réactivité

des cellules musculaires lisses est évaluée par l'ajout de 5 $\mu$ M de phényléphrine (Phe, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA), un vasoconstricteur  $\alpha$ -adrénergique dépendant des CMLVs, pendant 10 minutes ou jusqu'à ce qu'un plateau de vasoconstriction maximale soit atteint. La réactivité des cellules endothéliales est ensuite contrôlée par l'ajout de 5 $\mu$ M d'un vasodilatateur dépendant de l'endothélium : l'acétylcholine (Ach, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) durant 5 min ou jusqu'à atteindre un plateau de vasorelaxation maximale sur le vaisseau pré-contracté à la Phe.

L'évaluation de la réactivité vasculaire et *in fine* de l'intégrité des cellules vasculaires est mesurée à l'aide du logiciel Windiam en suivant l'évolution des diamètres artérielles en réponses aux agents vasoactifs. Ce test est réalisé à une pression constante de 75 mmHg pour les artères systémiques et de 25 mmHg pour les artères pulmonaires.

Afin de préserver au mieux l'intégrité vasculaire, il est à noter que le liquide physiologique dans lequel baigne le vaisseau au cours de l'expérimentation est remplacé toutes les 15 minutes et que la température est maintenue constante à 37°C.

## **6 Longueur de l'aorte ascendante, réactivité et mécanique d'anneaux de vaisseaux - artériographie de tension**

Cette partie de l'étude de la SEP a été réalisée par les Dr Lo et le Dr Liu du LBTI à Lyon, nos partenaires du projet ANR arterylastic.

Les souris sont anesthésiées avec de la kétamine (200 mg/kg) et de la xylazine (20 mg/kg), auquel sont ajoutées 500 UI d'héparine par injection intrapéritonéale. L'aorte ascendante (de la jonction sinotubulaire de la racine aortique à l'artère brachio-céphalique) est prélevée et rapidement placée dans une solution saline physiologique refroidie (PSS) bullée avec un gaz composé de 95% d'O<sub>2</sub> et de 5% de CO<sub>2</sub>. Après avoir coupé et mesuré la longueur des vaisseaux sous un microscope numérique, les vaisseaux sont transférés dans les chambres d'un myographe multi-canal (modèle 610M ; Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Danemark) rempli d'une solution physiologique (PSS) à 37°C (pH 7,4). Deux fils d'acier de 40  $\mu$ m de diamètre sont insérés dans la lumière des vaisseaux. L'anneau aortique est monté sur deux mâchoires de 200  $\mu$ m de diamètre. La pression effective est normalisée par l'étirement de l'aorte atteignant la tension correspondant à la pression cible de 100 mmHg. Ensuite, l'aorte est réglée à la distension correspondant à 90 mmHg. À cette pression de repos, les anneaux aortiques sont successivement pré-contractés avec 60 et 120 mM de KCl (K. L. Liu et al. 2016). Après une période d'équilibrage de 30 minutes à la pression de repos, les courbes concentration-réponse cumulées en réponse à des doses croissantes de phényléphrine (Phe, de 1x10<sup>-9</sup> à 3x10<sup>-6</sup> M), d'acétylcholine (Ach, de 1x10<sup>-8</sup> à 3x10<sup>-5</sup> M) et de nitroprussiate de sodium (SNP, un donneur de NO induisant une vasodilatation indépendante de l'endothélium et dépendante des CMLVs, de 1x10<sup>-9</sup> à 3x10<sup>-6</sup> M) sont établies (K. L. Liu et al. 2016). La vasoconstriction est exprimée par le changement de tension normalisé en fonction de la longueur du vaisseau ( $\Delta$ mN/mm de longueur de vaisseau). La relaxation est ensuite évaluée sur des vaisseaux pré-contractés avec une concentration de Phe induisant 40-60% de la

vasoconstriction maximale et est calculée comme le pourcentage d'inversion du tonus vasculaire induit par la Phe.

## **7 Pesée des cœurs**

Lors du prélèvement, le cœur est prélevé sur l'animal anesthésié, placé dans du liquide physiologique et conservé à -20°C. Lors de la pesée des cœurs, les oreillettes sont disséquées et séparées du reste de l'organe. Le ventricule droit est séparé de l'ensemble ventricule gauche/septum à l'aide de micro-ciseaux qui sera par la suite lui-même séparé en deux parties distinctes, septum et ventricule gauche. Les différents éléments sont brièvement déshumidifiés sur du papier buvard avant d'être pesés à l'aide d'une balance de précision. Enfin, les rapports poids total du cœur/ poids du corps, ainsi que le poids du ventricule gauche associé au septum (ou celui du ventricule droit) / poids total du corps sont calculés puis analysés en fonction des différents axes et groupes de souris.

## **8 Colorations histologiques et analyse d'images**

Cette partie de l'étude de la SEP a été réalisée par le Dr Lambert et son équipe du LBTI à Lyon.

Pour les analyses histologiques, la partie distale de la crosse aortique (entre l'artère sous-clavière gauche et le début de l'aorte thoracique descendante), fixées au formol et enrobées de paraffine (FFPE), est coupée en sections de 5 µm d'épaisseur et la coloration est effectuée après déparaffinage et réhydratation.

### **8.1 Coloration des fibres élastiques - Acide orcéine (selon la méthode de Shikata)**

La coloration à l'orcéine est réalisée en immergeant les sections aortiques pendant 30 minutes dans une solution commerciale d'orcéine acide (#010251, Diapath, Martinengo, Italie) (Shikata et al. 1974; Henwood 1983). Les lames sont ensuite rincées pendant 5 min dans différentes solutions (70% EtOH puis eau distillée, 100% EtOH pendant 5 min, EtOH/HCl (99,5/0,5, v/v) puis eau courante). La contre-coloration est ensuite effectuée pendant 5 min en utilisant la solution de contre-coloration à l'hématoxyline (#H-3401-500, Vector Laboratories, Newark, CA, USA) et les sections sont ensuite rincées à l'eau courante. Aucune contre-coloration n'est effectuée dans les sections utilisées pour l'analyse du nombre et des endommagements des lames élastiques, afin de faciliter les quantifications. Après déshydratation, les sections sont montées dans un milieu de montage organique (BioMount DPC, Biognost, Zagreb, Croatie) et scannées à l'aide du scanner de diapositives AXIO SCAN.Z1 (Zeiss, Rueil Malmaison, France).

### **8.2 Coloration des fibres de collagène - Rouge Picrosirius**

Les sections de tissu réhydratées sont colorées pendant 1h avec du rouge Sirius F3B (Direct Red 80,#365548, Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France) à 1g/L dans

une solution aqueuse saturée d'acide picrique (1,3%). Après deux lavages rapides dans de l'eau acidifiée à 0,5 %, les séquences sont déshydratées, montées et numérisées à l'aide du scanner de diapositives AXIO SCAN.Z1 (Zeiss) sous des filtres de fond clair et de polarisation linéaire, la biréfringence sous lumière polarisée étant hautement spécifique du collagène (Bauman et al. 2014). Les images biréfringentes des aortes ascendantes sont analysées par extraction de fibres fondée sur la transformée en Curvelets (Curvelet Transform-FIbeR, CT-FIRE) pour la longueur, l'épaisseur, la densité, la rectitude, l'angle et l'alignement des fibres, en utilisant le logiciel CT-FIRE V3.0 Beta (<https://eliceirilab.org/software/ctfire/>), comme décrit précédemment (Bredfeldt et al. 2014; Y. Liu et al. 2017; 2020).

## 9 Mesure de l'expression de gènes d'intérêt par PCR quantitative

### 9.1 Extraction de l'ADN et de l'ARN

Les aortes thoraciques descendante et abdominale préalablement prélevées et conservées à -80°C sont lysées à l'aide d'un appareil dédié (Precellys, Bertin Technologie, Montigny-le-Bretonneux, France) puis homogénéisées dans le réactif TRIzol (#15596026, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) et l'ARN est extrait après précipitation avec de l'isopropanol et des lavages à l'éthanol selon le protocole du fabricant. Les échantillons d'ARN sont de nouveau conservés à -80°C après congélation rapide dans l'azote liquide.

### 9.2 Transcription inverse et analyse quantitative par PCR en temps réel

Un microgramme d'ARN est retro-transcrit en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide du kit de synthèse d'ADN complémentaire iScript (#1708840, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), selon le protocole du fabricant. L'ADNc ou l'ADN est utilisé pour la PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) à l'aide du kit SsoAdvanced SYBR Green Supermix (#1725270, Bio-Rad Laboratories) selon le protocole du fabricant. L'expression des gènes est normalisée par rapport à la bêta-actine. Les gènes d'intérêt sont : élastine (*Eln*), fibrilline-1 (*Fbn1*), lysyl-oxydase (*Lox*), lysyl-oxydase-like 1 (*Lox1*), fibuline 5 (*Fbn5*), collagène de type I alpha-1 (*Col1a1*), collagène de type I alpha-2 (*Col1a2*), collagène de type III alpha-1 (*Col3a1*). Les séquences d'amorces utilisées pour les analyses sont listées ci-dessous :

mRNA	ForwardPrimer(5'-3')	ReversePrimer(5'-3')
collagen type I, alpha 1 ( <i>Col1a1</i> )	GCGAAGGCAACAGTCGATTC	CCCAAGTTCGGTGTGACTC
collagen type I, alpha 2 ( <i>Col1a2</i> )	CAAGCATGTCTGGTTAGGAGAG	AGGACACCCCTTCTACGTTGT
collagen type III, alpha 1 ( <i>Col3a1</i> )	CAGCTGGCCTTCCTCAGACTT	GCTGTTTTTGCAGTGGTATGTAATG
fibrillin1 ( <i>Fbn1</i> )	TGCCAGCAGCGAGATGGACGA	TGGCGAGGCTCACGTTGGCTT

fibulin 5 ( <i>Fbln5</i> )	TTGAGGAAGATGGCATTCACT	GGCTGGTTCACACACTCGT
lysyl oxidase ( <i>Lox</i> )	AATTCAGCCACTATGACCTGCTTGA	GTAGCGAATGTACAGCGTACAACA
lysyl oxidase homolog 1 ( <i>Lox1</i> )	TATGCCTGCACCTCTCACAC	TGTCCGCATTGTATGTGTCAT
tropoelastin ( <i>El</i> )	AAGCTGCTGCTAAGGCTGC	TGCAACTCCTCCACCTGGGAA

## 10 Mesure de l'expression de protéines d'intérêt par western blot

Les aortes thoraciques descendantes congelées à l'issu du prélèvement initial sont homogénéisées dans 200µl de tampon RIPA (Tris HCl, pH 8 [50 mM]final, NaCl [150 mM]final, NP40 [1%]final, DOC (désoxycholate de sodium) [0.5%] final, SDS [0,1%] final, inhibiteur de protéases 1x final, PMSF [1 mM] final) et lysées à l'aide de billes de céramique avec un appareil dédié (Precellys 24, Bertin Technologie, Montigny-le-Bretonneux, France) (6000rpm, 3x10s) ou 300µl de tampon RIPA dans un appareil dédié (Polytron, kinematica, Malvern, Suisse) pour extraire les protéines. Le lysat est centrifugé à 9500 x g à 4°C pendant 10 min, et le surnageant est de nouveau centrifugé à 9500 x g à 4°C pendant 10 min, avant de recueillir le surnageant. La concentration en protéines est calculée par un test de Bradford utilisant l'albumine de sérum bovin (BSA) comme standard, selon le protocole du fabricant (réactif Bradford, #5000006, Bio-rad, Marnes-la-Coquette, France). 15 à 20 µg de protéines sont alors séparées par électrophorèse sur des gels de polyacrylamide SDS à 8% (fibrilline-1, tropoélastine) ou 12% (Lox) pendant 20 min à 80V puis pendant 1h20 à 2h à 120V et transférées sur des membranes de difluorure de polyvinylidène et des membranes de nitrocellulose. Les membranes sont ensuite bloquées pendant 1h à température ambiante avec du lait écrémé à 5% (tropoélastine) ou de la BSA à 5% (fibrilline-1, Lox) dans du TRIS-buffered saline (TBS) avec du Tween 20 (0,1%). Les membranes sont ensuite incubées pendant une nuit à 4°C avec les anticorps primaires suivants dans du TBS-Tween 20-1% de lait écrémé ou de BSA : anti-tropoélastine (1/1000, PR385, Elastin Products Company, Ow-ensville, MO, USA), anti-fibrilline-1 (1/1000, Ab53076, Abcam, Cambridge, Royaume-Uni), anti-Lox (1/1000, D8F2K, Cell signaling, Danvers, Massachusetts). Les membranes sont ensuite incubées pendant 1h à température ambiante avec l'anti-IgG approprié conjugué à la peroxydase de raifort (anti-lapin 1/5000, #115-035-003, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) avant et après trois lavages dans du TBS, Tween 0,1%. Les protéines sont visualisées par chimioluminescence renforcée avec le substrat ECL de Western Blot (Clarity, Bio-Rad) sur un analyseur ChemiDoc (Bio-Rad). La quantité relative de protéines est mesurée par densitométrie (Image Lab, Bio-Rad) et exprimée en tant que rapport contenu en protéine d'intérêt / contenu en actine. Afin de pouvoir comparer les différents gels entre eux, un échantillon test, identique sur tous les gels, est déposé afin d'effectuer un rapport d'expression protéique entre les gels.

## 11 Culture cellulaire

### 11.1 Culture primaire de CMLVs

Les CMLVs sont isolées à partir d'aortes entières de souris. Dix-huit animaux ont été utilisés pour cette expérimentation (*Eln<sup>+/+</sup>* et *Eln<sup>+/-</sup>*, mâles et femelles). Pour chaque culture cellulaire, une aorte ascendante entière est digérée enzymatiquement avec de la collagénase de type 2 (1 mg/mL) pendant 30 minutes à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. L'adventice est ensuite retirée mécaniquement et le tube restant composé de l'intima et de la media est coupé en morceaux d'environ 2 mm de long, qui sont ensuite digérés dans une solution de collagénase de type 2 (1 mg/mL) et de l'élastase (0,5 mg/mL) pendant 40 min à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, avant de procéder à une dissociation mécanique par aspiration/refoulement avec une pipette mécanique pendant 10 min. La suspension obtenue est centrifugée à 200 × g pendant 10 min, et les cellules sont recueillies et ensemencées dans un puits d'une plaque 24 puits dans du milieu Dulbecco-Modified Eagle Medium (DMEM), contenant 20 % (v/v) de sérum fœtal bovin (FBS), 1 % (v/v) de solution de pénicillin/streptomycine et 1 % de solution d'acides aminés non-essentiels (NEAA), maintenu dans un air humidifié à 5 % de CO<sub>2</sub> à 37°C. Juste avant la confluence, les cellules sont isolées par trypsinisation, et la culture cellulaire est amplifiée jusqu'à son utilisation au 6<sup>ème</sup>-7<sup>ème</sup> passage.

### 11.2 Prolifération (MTT)

Le test MTT est utilisé pour mesurer l'activité métabolique cellulaire en tant qu'indicateur de prolifération. Ce test colorimétrique est fondé sur la réduction d'un sel de tétrazolium jaune (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium ou MTT) en cristaux de formazan violet par les cellules métaboliquement actives (= vivantes) uniquement. Les cellules viables contiennent des enzymes oxydoréductases dépendantes du NAD(P)H qui réduisent le MTT en formazan. Les CMLVs sont cultivées dans des plaques de 96 puits dans du DMEM-20% FBS complété par 0, 5, 10 ou 50µg/mL de SEP. Étant donné que dans les cultures cellulaires, la SEP ne subit potentiellement pas de perte due à la métabolisation *in vivo*, les concentrations de SEP utilisées pour le traitement des CMLVs en culture sont inférieures à celles utilisées pour l'injection intraveineuse chez la souris. Après 1, 3 ou 6 jours, les cellules sont incubées pendant 4h à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> avec 15µL de solution de colorant (cat. #G4101, Promega, Madison, WI, USA). Ensuite, les cristaux de formazan insolubles sont dissous en utilisant 100µl de solution de solubilisation (cat. #G4102, Promega, Madison, WI, USA) pendant 1h à température ambiante puis sont homogénéisés à l'aide d'une pipette et la solution colorée résultante est quantifiée en mesurant l'absorbance à 560 nm sur un spectrophotomètre multi-puits (1681000, Bio-rad, Marnes-la-Coquette, France). Concernant l'expérimentation jusqu'au jour 6, le milieu de culture cellulaire est remplacé au jour 3 par du milieu frais (contenant ou non de la SEP, selon le cas).

### 11.3 Quantification de l'élastine extracellulaire par test ELISA

Les CMLVs sont cultivées dans des plaques de 96 puits dans du DMEM contenant 1% de FBS jusqu'à ce qu'elles atteignent la confluence totale. Elles sont ensuite baignées dans du DMEM-1% FBS complété par 0, 5, 10 ou 50µg/mL de SEP. Après 1, 3 ou 6

jours, les CMLVs sont exposées à l'anticorps primaire dirigé contre l'élastine (1:1500 ; ab21610, Abcam, Paris, France) avant l'application de l'anticorps secondaire anti-lapin (1/5000, cat. #111-035-003, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) couplé à la peroxydase de raifort (HRP). Cette opération est suivie de l'ajout du substrat de la HRP, la 3,3',5,5' -tétraméthylbenzidine (TMB), la réaction étant arrêtée par l'ajout de 100µl d'acide sulfurique (0,3M). Après 10 min, le produit final de la réaction est ensuite quantifié en mesurant son absorbance à 450 nm sur un spectrophotomètre multi-puits (1681000, Bio-rad, Marnes-la-Coquette, France).

## 12 Analyse statistique

Les comparaisons statistiques sont effectuées à l'aide d'ANOVA à deux, trois ou quatre facteurs, suivies, si nécessaire, par des tests post hoc Least Significant Difference (LSD) de Fisher pour les comparaisons deux à deux. Les logiciels utilisés sont Statistica 6.1 (StatSoft, Tulsa, OK, USA), ou GraphPad Prism 9 (GraphPad Software. Inc., San Diego, USA). Sauf précisions apportées dans la légende des figures, les résultats sont exprimés comme les valeurs moyennes  $\pm$  erreur standard de la moyenne (SEM). Le seuil de significativité statistique a été fixé à  $p \leq 0,05$ . n correspond au nombre d'animaux utilisés dans chaque expérimentation.

# Résultats

# 1 Axe correction des effets délétères de la déficience génétique en élastine

## 1.1 Article 1 : Impact physiologique d'une protéine élastique synthétique dans les maladies artérielles liées aux altérations des fibres élastiques, effet sur l'aorte ascendante de souris mâles et femelles haploinsuffisantes en élastine.

Les premières expérimentations menées par le consortium ont permis la rédaction d'un premier article de façon collégiale sur l'analyse des effets de la SEP qui vient d'être publié dans International Journal of Molecular Sciences (IF = 6,2) (Boëté et al. 2022). Ce premier article rapporte les conclusions de l'étude de l'effet de la SEP sur des souris présentant une déficience génétique en élastine  $Eln^{+/+}$ , et leur témoins  $Eln^{+/-}$ , mâles et femelles âgés de 6 mois. Nous avons ainsi étudié sous différents angles l'effet cardiovasculaire de la SEP, masse cardiaque, pression artérielle et structure/fonction de l'aorte, à l'aide de différentes techniques (artériographie de pression et artériographie de tension, mesure de la pression artérielle par cathétérisme, histologie, qPCR, western blots et étude sur primo-cultures de cellules musculaires lisses aortiques)

L'hémizygotie du gène de l'élastine chez les animaux (souris  $Eln^{+/-}$ ) ou les humains (syndrome Williams Beuren ou sténose aortique supra-valvulaire isolée) entraîne un rétrécissement artérielle, une augmentation du nombre de lames élastiques ainsi qu'un désépaississement de ces dernières, une diminution du contenu artériel en élastine, un remodelage et une rigidifications des lames élastiques et des grosses artères élastiques, une altération de l'hémodynamique, une hypertrophie cardiaque et une hypertension (Fhayli, Boëté et al. 2019; Pezet et al. 2008; Duque Lasio et Kozel 2018). Les souris  $Eln^{+/-}$  ne voient pas leur qualité ni leur espérance de vie altérée par cette déficience génétique tandis que les patients atteints du syndrome de Williams peuvent présenter une détérioration sévère de leur fonction cardiovasculaire de façon précoce, notamment en raison de la présence de sténoses aortiques, augmentant de façon drastique la postcharge cardiaque, limitant la perfusion en aval et conduisant potentiellement à la mort (Mylène Pezet et al. 2008b; Duque Lasio et Kozel 2018; Ewart et al. 1993). Les souris  $Eln^{+/-}$  présentent une meilleure compensation de l'hémizygotie pour l'élastine que les patients SWB, en effet, alors que les souris  $Eln^{+/-}$  (qui possèdent environ 50% de la quantité l'élastine normale à l'instar des patients SWB) ne présentent pas de sténoses aortiques, une étude sur des souris  $Eln^{-/-}$  « humanisées » pour lesquelles la production d'élastine est contrôlée par le gène de l'élastine humaine dans un chromosome artificiel bactérien (hBAC) et produisant seulement 25% de la quantité normale d'élastine se rapprochent de la maladie humaine avec un fort épaississement de la paroi artérielle (Hirano et al. 2007).

Physiologiquement, la dégradation des fibres élastiques inévitable avec l'avancée en âge ne peut être compensée par leur néosynthèse puisqu'elles ne sont produites que jusqu'à la fin de l'adolescence, les stocks/structures de fibres élastiques présents à la fin de l'adolescence étant progressivement altérés au cours du vieillissement. Par conséquent, afin de prévenir ou de traiter les dégradations des fibres élastiques et de la fonction artérielle, plusieurs traitements pharmacologiques visant à limiter les altérations des fibres élastiques, à réinduire la formation de fibres élastiques par les

CMLVs et/ou améliorer l'élasticité artérielle ont été évalués, avec une réelle efficacité chez la souris, comme le minoxidil ou l'extrait d'aneth (Wassim Fhayli et al. 2019a; Coquand-Gandit et al. 2017; W. Fhayli et al. 2019; Wassim Fhayli et al. 2020). Cependant, à ce jour, aucun traitement n'a passé le stade des essais cliniques et/ou montré un réel effet positif d'amélioration des propriétés mécaniques vasculaires chez les patients SWB. Le minoxidil, par exemple, n'a pas été démontré comme clairement efficace chez les patients SWB, mais il faut toutefois noter que les doses autorisées chez l'humain étaient beaucoup plus faibles que celles utilisées chez la souris et la durée relative du traitement chez l'humain (1 an, soit 1/80 de la durée de vie) était aussi beaucoup plus faible que celle utilisée chez les souris (3 mois, soit 1/8 de la durée de vie) (Kassai et al. 2019). Si la grande majorité des études menées jusqu'à présent se sont focalisées sur la modulation des voies de signalisation cellulaires impliquées dans la synthèse et/ou la protection des fibres élastiques artérielles et l'amélioration ultérieure de la mécanique artérielle, l'objectif de notre étude est de tester, par l'administration intraveineuse d'une protéine synthétique élastique exogène (SEP), une nouvelle stratégie à visée double :

- Améliorer directement les propriétés mécaniques des fibres élastiques artérielles altérées,
- Et stimuler les voies de signalisation conduisant à une néosynthèse de fibres élastiques.

La SEP a été conçue pour reproduire les principales fonctions physico-chimiques et biologiques de la tropoélastine native (brevet #WO2017194761, (DEBRET et al. 2017)). Elle comprend des domaines hautement hydrophobes avec des répétitions d'hexapeptides VGVA/LPG qui ciblent également le complexe récepteur de l'élastine. Ces domaines hydrophobes sont interrompus par des séquences de réticulation riches en lysine, et la SEP se termine par le domaine C-terminal 36 de la tropoélastine humaine connu pour favoriser son assemblage sur les microfibrilles. *In vitro*, la SEP intègre activement les dépôts fibrillaires d'élastine grâce à l'activité enzymatique de *Lox* (brevet #WO2017194761, (DEBRET et al. 2017)).

Ainsi, nous faisons ici l'hypothèse que la SEP pourrait améliorer les propriétés élastiques altérées des souris *Eln*<sup>+/-</sup>, soit *via* une intégration directe de la SEP dans les fibres élastiques aortiques dégradées, soit par un effet de signalisation cellulaire (G. Faury 1998; Le Page et al. 2019; Wahart et al. 2019). En effet, une activité de la SEP sur la signalisation cellulaire est attendue du fait de la présence de séquences reconnues par l'intégrine  $\alpha\beta3$  (Bax et al. 2009) et le complexe récepteur de l'élastine (ERC), connu pour être impliqué dans le métabolisme de l'élastine et la fonction cellulaire (G. Faury 1998; Wahart et al. 2019; Bax et al. 2009; Rodgers et Weiss 2004) et présent au moins dans les cellules musculaires lisses endothéliales et vasculaires (G. Faury 1998; Yamashiro et Yanagisawa 2020). Dans la présente étude, cette stratégie a été testée chez des souris *Eln*<sup>+/-</sup> et s'est avérée efficace pour améliorer la structure/fonction artérielle aortique (Boëté et al. 2022).



Article

# Physiological Impact of a Synthetic Elastic Protein in Arterial Diseases Related to Alterations of Elastic Fibers: Effect on the Aorta of Elastin-Haploinsufficient Male and Female Mice

Quentin Boëté <sup>1</sup>, Ming Lo <sup>2</sup>, Kiao-Ling Liu <sup>2</sup>, Guillaume Vial <sup>1</sup>, Emeline Lemarié <sup>1</sup>, Maxime Rougelot <sup>1</sup>, Iris Steuckardt <sup>1</sup>, Olfa Harki <sup>1</sup>, Axel Couturier <sup>1</sup>, Jonathan Gaucher <sup>1</sup>, Sophie Bouyon <sup>1</sup>, Alexandra Demory <sup>1</sup>, Antoine Boutin-Paradis <sup>1</sup>, Naima El Kholti <sup>2</sup>, Aurore Berthier <sup>2</sup>, Jean-Louis Pépin <sup>1</sup>, Anne Briançon-Marjollet <sup>1</sup>, Elise Lambert <sup>2</sup>, Romain Debret <sup>2</sup> and Gilles Faury <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Université Grenoble Alpes, Inserm, CHU Grenoble Alpes, HP2, U1300, 38000 Grenoble, France

<sup>2</sup> Institut de Biologie et Chimie des Protéines UMR5305-LBTI, CNRS, Lyon-7, Passage du Vercors, CEDEX 07, 69367 Lyon, France

\* Correspondence: gilles.fauy@univ-grenoble-alpes.fr; Tel.: +33-4-76-63-75-39

**Abstract:** Elastic fibers, made of elastin (90%) and fibrillin-rich microfibrils (10%), are the key extracellular components, which endow the arteries with elasticity. The alteration of elastic fibers leads to cardiovascular dysfunctions, as observed in elastin haploinsufficiency in mice (*Eln*<sup>+/-</sup>) or humans (supravalvular aortic stenosis or Williams–Beuren syndrome). In *Eln*<sup>+/+</sup> and *Eln*<sup>+/-</sup> mice, we evaluated (arteriography, histology, qPCR, Western blots and cell cultures) the beneficial impact of treatment with a synthetic elastic protein (SEP), mimicking several domains of tropoelastin, the precursor of elastin, including hydrophobic elasticity-related domains and binding sites for elastin receptors. In the aorta or cultured aortic smooth muscle cells from these animals, SEP treatment induced a synthesis of elastin and fibrillin-1, a thickening of the aortic elastic lamellae, a decrease in wall stiffness and/or a strong trend toward a reduction in the elastic lamella disruptions in *Eln*<sup>+/-</sup> mice. SEP also modified collagen conformation and transcript expressions, enhanced the aorta constrictive response to phenylephrine in several animal groups, and, in female *Eln*<sup>+/-</sup> mice, it restored the normal vasodilatory response to acetylcholine. SEP should now be considered as a biomimetic molecule with an interesting potential for future treatments of elastin-deficient patients with altered arterial structure/function.

**Keywords:** aorta; structure; mechanics; reactivity; elastic fiber synthesis/repair; pharmacotherapy; synthetic elastic protein; elastin haploinsufficiency



**Citation:** Boëté, Q.; Lo, M.; Liu, K.-L.; Vial, G.; Lemarié, E.; Rougelot, M.; Steuckardt, I.; Harki, O.; Couturier, A.; Gaucher, J.; et al. Physiological Impact of a Synthetic Elastic Protein in Arterial Diseases Related to Alterations of Elastic Fibers: Effect on the Aorta of Elastin-Haploinsufficient Male and Female Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 13464. <https://doi.org/10.3390/ijms232113464>

Academic Editor: Fernando Rodriguez-Pascual

Received: 13 September 2022

Accepted: 25 October 2022

Published: 3 November 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

The arteries all play the role of tubings, allowing for the circulation of blood from the heart to the organs. In a systemic circulation, arteries make it possible for blood to provide cells with oxygen, nutrients and different signaling molecules that they need [1]. This basic and vital role of systemic arteries is complemented by additional functions, which depend on their structure and location in the arterial tree. The large arteries located close to the heart, i.e., the aorta and the first part of its proximal branches, are responsible for the smoothing of the discontinuous flow and pulsatile pressure of the blood ejected by the heart (Windkessel effect) [2,3]. Smaller sized arteries and arterioles, located downstream of the arterial tree, participate less in the Windkessel effect and are more involved in the regulation of the distribution of the blood flow to the different organs, depending on the evolution of the need of each organ as a function of time or body activity [3,4].

The smoothing function of large arteries is made possible by their particular structure, with a large proportion of their wall being made of extracellular elastic fibers, which represent about 40–50% of the dry weight in the thoracic aorta [5,6]. The elastic fibers are

arranged into multiple circumferentially oriented and concentric elastic lamellae, which provide the arteries with their main mechanical property—elasticity [7–9].

The main function of medium and small sized arteries, i.e., blood distribution to the organs, is related to the presence of a low number of elastic lamellae and a large proportion of vascular smooth muscle cells (VSMCs) in their walls, whose contraction reduces the vessel diameter and decreases blood flow. The differential contraction levels of VSMCs in the different arteries, made simultaneously possible by nervous or hormonal control, permit adjusting the perfusion of each organ to its exact need at any moment [1,4].

Systemic arteries could, however, undergo structural and functional alterations due to degradative aging processes, extrinsic deleterious events, such as sleep apnea/intermittent hypoxia, or genetic deficiency in some components of the elastic fibers made of  $\approx 90\%$  elastin (= polymer of the precursor tropoelastin),  $\approx 10\%$  microfibrillar components, especially fibrillin-1, and several quantitatively minor components, although of major importance, such as lysyl oxidase (LOX), which is responsible for the cross-linking of tropoelastin [10]. These conditions induce endothelial and/or smooth muscle cell dysfunctions as well as general remodeling of the extracellular matrix (ECM), including enzymatic or non-enzymatic degradation of elastic fibers. This results in abnormal reactivity and stiffening of the arteries, thereby limiting their action on blood pressure and flux smoothing, subsequently leading to altered hemodynamics and tissue perfusion [9,11–13].

Hemizyosity of the elastin gene in animals (*Eln*<sup>+/-</sup> mice) or humans, e.g., patients with Williams–Beuren syndrome (WBS) or isolated supravalvular aortic stenosis (SVAS), leads to narrower arteries, lower arterial elastin content, degraded, thinner and/or more numerous elastic lamellae, abnormal/stiffened elastic lamellae and large arteries, altered hemodynamics, cardiac hypertrophy and hypertension, as well as, in human patients, large artery stenoses [9,12,14–19]. Nevertheless, *Eln*<sup>+/-</sup> mice live relatively well, while Williams syndrome patients could present severe deterioration of their cardiovascular function, in particular due to the presence of aortic stenoses, drastically increasing the cardiac postcharge, limiting downstream perfusion and potentially leading to death [12,14,17].

Physiologically, in adults, the degradation of elastic fibers cannot be compensated for by their neosynthesis, since they are produced only until the end of childhood or adolescence, the elastic fiber stock/structures present at this step of life being progressively altered during adulthood and aging. Therefore, in order to prevent or treat the degradations of arterial elastic fibers and function occurring in the above-mentioned conditions, several pharmacological treatments aiming at limiting elastic fiber alterations or re-inducing elastic fiber formation by VSMCs have been evaluated [9]. In addition to some chemokines and growth factors [20], the intracellular concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) also controls the synthesis of tropoelastin; increased  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  stimulates ERK1/2 phosphorylation, which ultimately leads to decreased tropoelastin synthesis, and vice versa.  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  can be modulated either directly by use of drugs regulating the calcium influx (calcium ionophores) or indirectly by molecules triggering cell membrane hyperpolarization ( $\text{K}^+$  channel openers), which closes the voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channel and stops  $\text{Ca}^{2+}$  influx [21–23]. Minoxidil, an ATP-dependent  $\text{K}^+$  ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) channel opener and a potent antihypertensive vasodilator, has been shown to increase in vitro elastin synthesis by cultured VSMCs and in vivo arterial elastin content and/or elastic lamellae thickness in several (young or aged) rat and mouse models (spontaneously hypertensive rats (SHR), brown Norway (BN) rats, aged C57Bl/6J mice and *Eln*<sup>+/-</sup> mice) [21,24–27]. The chronic minoxidil treatment of mice, hemizygous for the elastin gene or not, also resulted in neosynthesis of the elastic fibers, protection of pre-existing elastic fibers, improvement of arterial elasticity and cerebral perfusion and lower blood pressure [25,27,28]. However, minoxidil treatment could induce undesirable side-effects, such as oedema or cardiac hypertrophy, reduced by the concomitant use of antidiuretics or other drugs, and presented a limited effect in a recent clinical trial [15]. Other  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel openers also stimulate elastin synthesis—in vivo for diazoxide or nicorandil [26,29], or in vitro in cultured rat VSMCs for pinacidil and some derivatives of cromakalim or diazoxide [26,30,31]. Chronic treatment of aged mice with dill extract also

reactivated tropoelastin (*Eln*) and lysyl-oxidase-like-1 (*Loxl1*) gene expressions, protected pre-existing elastic lamellae and induced elastic fiber neosynthesis, and it decreased the aortic stiffness of the aging aortic wall, although the exact mechanisms are unknown [32].

These pharmacotherapeutic strategies were all based on the modulation of the cellular signaling pathways involved in arterial elastic fiber synthesis/protection and subsequent improvement of arterial mechanics in deleterious conditions, but they could present different undesirable side effects. Here, we evaluated the efficiency of a new strategy, aiming at directly improving the mechanical properties of the altered arterial elastic fibers by intravenous administration of an exogenous elastino-mimetic synthetic elastic protein (SEP, 55 kDa). SEP was designed to recapitulate the main physicochemical and biological functions of native tropoelastin (patent #WO2017194761). It includes highly hydrophobic domains with VGVA/LPG hexapeptide repeats, which also target the elastin receptor complex. These hydrophobic domains are interrupted by lysine-rich crosslinking sequences, and SEP terminates with the C-terminal domain 36 of human tropoelastin, which is known to favor its assembly onto microfibrils [33]. In vitro, SEP actively integrates elastin fibrillar deposits through LOX enzymatic activity (patent #WO2017194761). Here, we hypothesize that either a direct integration of SEP into the degraded aortic elastic fibers and/or a cellular signaling effect of SEP could improve the altered elastic properties of *Eln*<sup>+/-</sup> mice. An action of SEP on cellular signaling is expected, since it includes sequences recognized by integrin  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  [34] and the elastin receptor complex (ERC), known to be involved in elastin metabolism and cell function [34–37] and present at least in endothelial and vascular smooth muscle cells [35,38]. In the present study, this strategy was tested in *Eln*<sup>+/-</sup> mice and was shown to be efficient in improving the arterial structure/function and general cardiovascular condition of these animals.

## 2. Results

The statistical analysis of the results was performed by using three- or four-way ANOVAs (variables: sex, genotype, treatment and, where appropriate, aorta intraluminal pressure). In order to clarify the presentation of the results, only the statistical facts in relation to the impact of SEP treatment are presented in the main text of the article, while the statistical facts in relation to the impact of genotype or sex are presented in Supplementary Materials Data S1.

### 2.1. Body and Heart Weights

SEP treatment did not change the body weight in all animal groups, while it reduced hematocrit in females, not males, independently of the genotype. Total heart and left ventricle weights to body weight ratios, similar in untreated male and female animals, were found to be higher in males than in females in SEP-treated mice, independently of the genotype (Table 1).

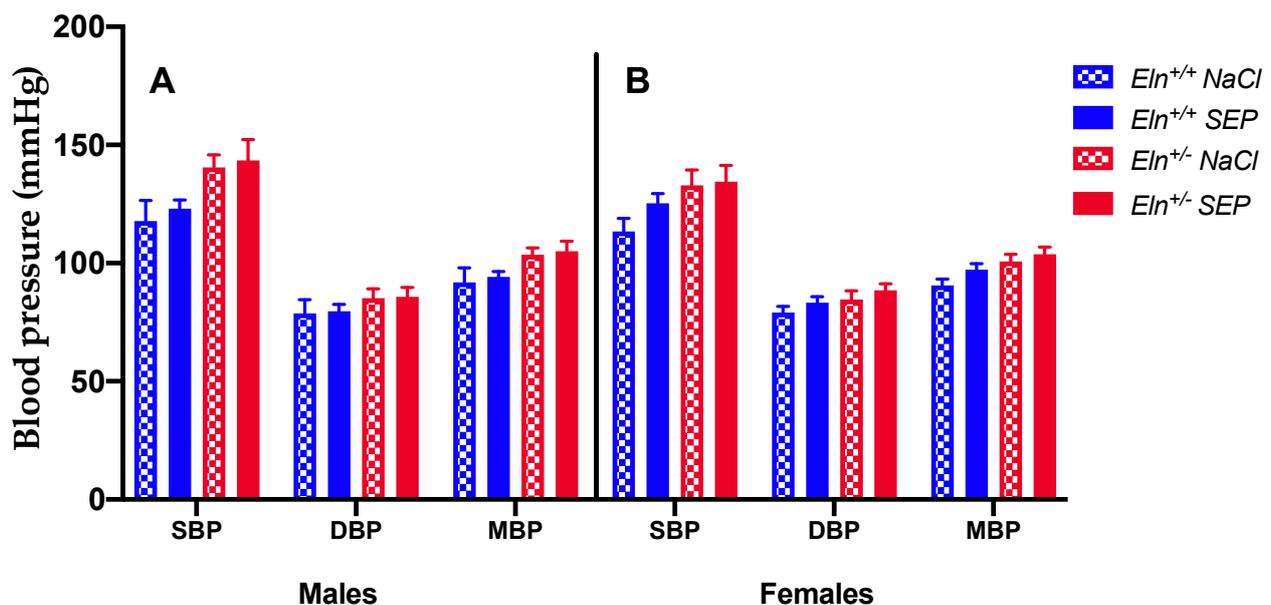
**Table 1.** Body weight, hematocrit and ratios of total heart and left ventricle plus septum weights to body weight.

	Male				Female			
	<i>Eln</i> <sup>+/+</sup>		<i>Eln</i> <sup>+/-</sup>		<i>Eln</i> <sup>+/+</sup>		<i>Eln</i> <sup>+/-</sup>	
	NaCl	SEP	NaCl	SEP	NaCl	SEP	NaCl	SEP
BW (g)	34.3 ± 1.2	34.7 ± 1.1	36.2 ± 1.6	34.1 ± 1.0	26.6 ± 0.8	25.7 ± 0.7	27.5 ± 1.2	27.3 ± 1.5
Hematocrit (%) <sup>&amp;</sup>	37.8 ± 1.4	38.7 ± 0.8	39.4 ± 1.3	40.7 ± 1.4	39.9 ± 1.0	37.9 ± 1.8	40.0 ± 1.8	35.7 ± 1.3
HW/BW (%) <sup>§</sup>	0.46 ± 0.01	0.48 ± 0.01	0.48 ± 0.02	0.52 ± 0.01	0.47 ± 0.02	0.45 ± 0.01	0.49 ± 0.02	0.47 ± 0.02
LV+S/BW (%) <sup>§</sup>	0.35 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.36 ± 0.02	0.41 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.35 ± 0.01

BW: Body weight, HW: Heart weight, LV: Left ventricle weight, S: Septum weight. <sup>&</sup> significant interaction between sex and treatment, independently of genotype (three-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ), showing that SEP decreased hematocrit in females, not males (post hoc Fisher's least significant difference (LSD) tests,  $p \leq 0.05$ ). <sup>§</sup> significant interaction between sex and treatment, independently of genotype (three-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ), showing that, although no significant difference could be detected between untreated male and female mice, SEP treatment led to heavier HW/BW and LV+S/BW in male compared to female animals (post hoc Fisher's least significant difference (LSD) tests,  $p \leq 0.05$ ). Control animals were injected with the same volume of 0.9% NaCl. Values are mean ± SEM. n = 7–10 per group.

## 2.2. Blood Pressure

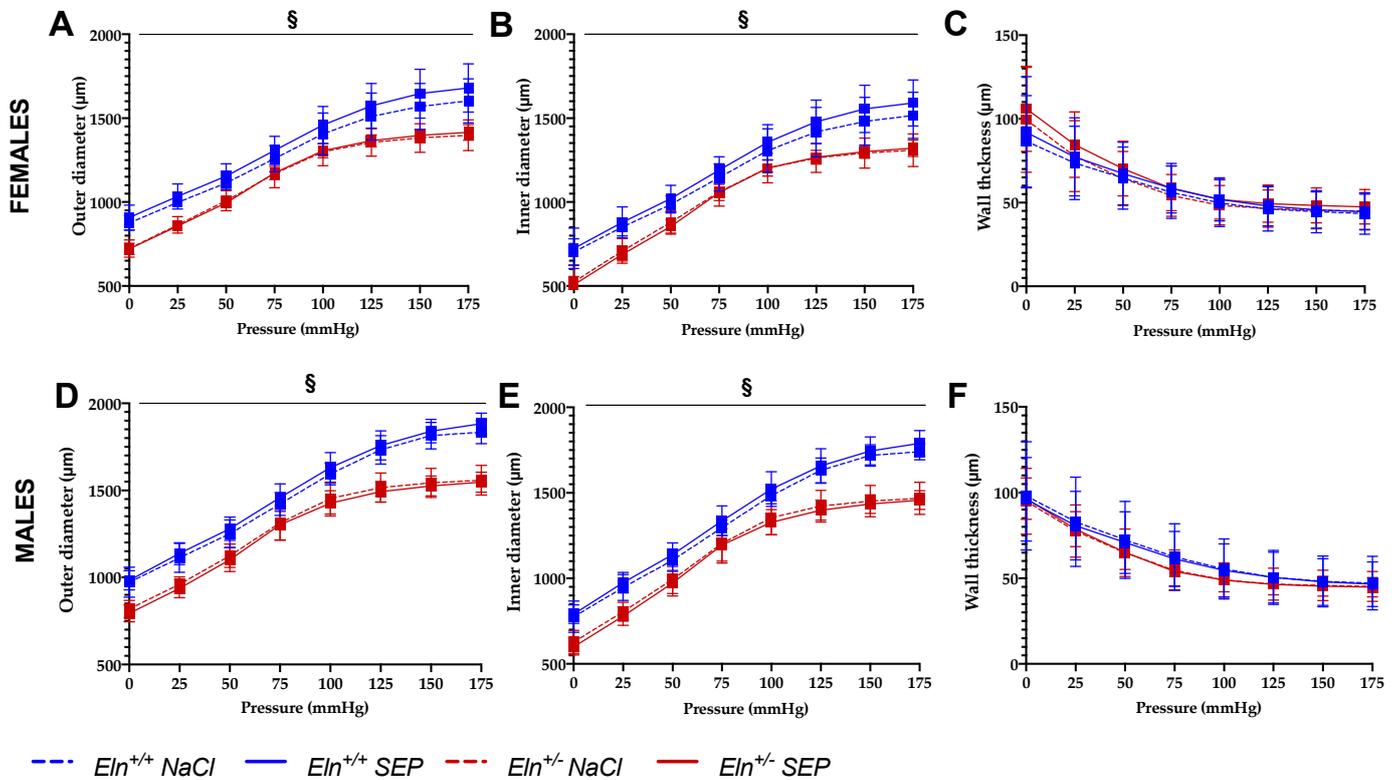
The treatment with SEP did not significantly change blood pressure in all animal groups (Figure 1).



**Figure 1.** Systolic, diastolic and mean arterial blood pressures. The measurements were performed 3 days after NaCl (control) or SEP intravenous injection in the caudal vein of male and female mice of *Eln*<sup>+/+</sup> or *Eln*<sup>+/-</sup> genotypes. (A) Males, (B) Females, SBP: Systolic Blood Pressure, DBP: Diastolic Blood Pressure, MBP: Mean Blood Pressure. No significant effect of SEP treatment could be detected (four-way ANOVA and three-way ANOVAs for each sex,  $p > 0.05$ ). Control animals were injected with the same volume of 0.9% NaCl. Values are mean ± SEM. n = 4–7 per group.

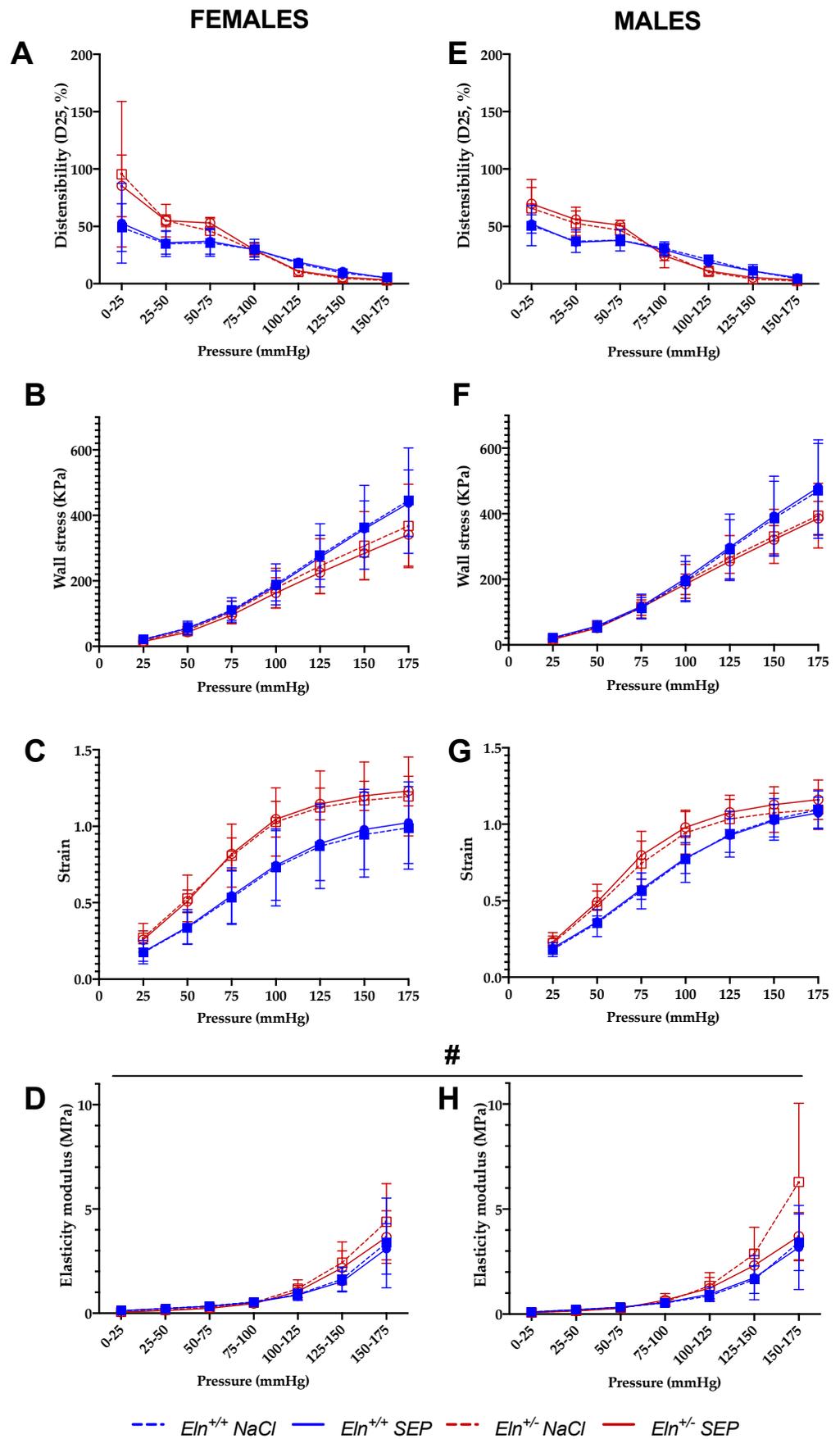
### 2.3. Biomechanics of the Cannulated Ascending Aorta

Treatment with SEP induced an elevation of the aortic outer (OD) and inner (ID) diameters in *Eln*<sup>+/+</sup>, not *Eln*<sup>+/-</sup>, animals of both sexes (Figure 2A,B,D,E) and did not change the wall thickness in all groups (Figure 2C,F) compared to corresponding untreated mice.



**Figure 2.** Diameter–pressure and wall-thickness–pressure curves of the cannulated ascending aorta. The measurements were performed by pressure arteriography 3 days after NaCl (control) or SEP intravenous injection in the caudal vein of male and female mice of *Eln*<sup>+/+</sup> or *Eln*<sup>+/-</sup> genotypes ((A–C): females; (D–F): males). (A,D): outer-diameter–pressure relation. (B,E): inner-diameter–pressure relation. (C,F): wall-thickness–pressure relation. § general significant interaction between genotype and treatment (three-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ), showing that SEP treatment induced a diameter elevation in *Eln*<sup>+/+</sup>, not *Eln*<sup>+/-</sup>, mice, independently of sex (post hoc Fisher’s least significant difference (LSD) tests,  $p \leq 0.05$ ). Control animals were injected with the same volume of 0.9% NaCl. Values are mean  $\pm$  SEM.  $n = 7$ –10 per group.

No significant improvements of the aortic distensibility (Figure 3A,E), circumferential wall stress (Figure 3B,F) and wall strain (Figure 3C,G) were observed in SEP-treated mice compared to their untreated counterparts. Interestingly, the aorta incremental elastic modulus ( $E_{inc}$ ) (Figure 3D,H) was generally and significantly decreased in SEP-treated animals compared to untreated mice, independently of intraluminal pressure, genotype and sex (four-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ). The SEP-induced decrease in  $E_{inc}$  was especially marked at 175 mmHg, independently of sex and genotype (four-way ANOVA followed by LSD test,  $p \leq 0.05$ ), and of greater amplitude in male mice (three-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ) (Figure 3D,H).

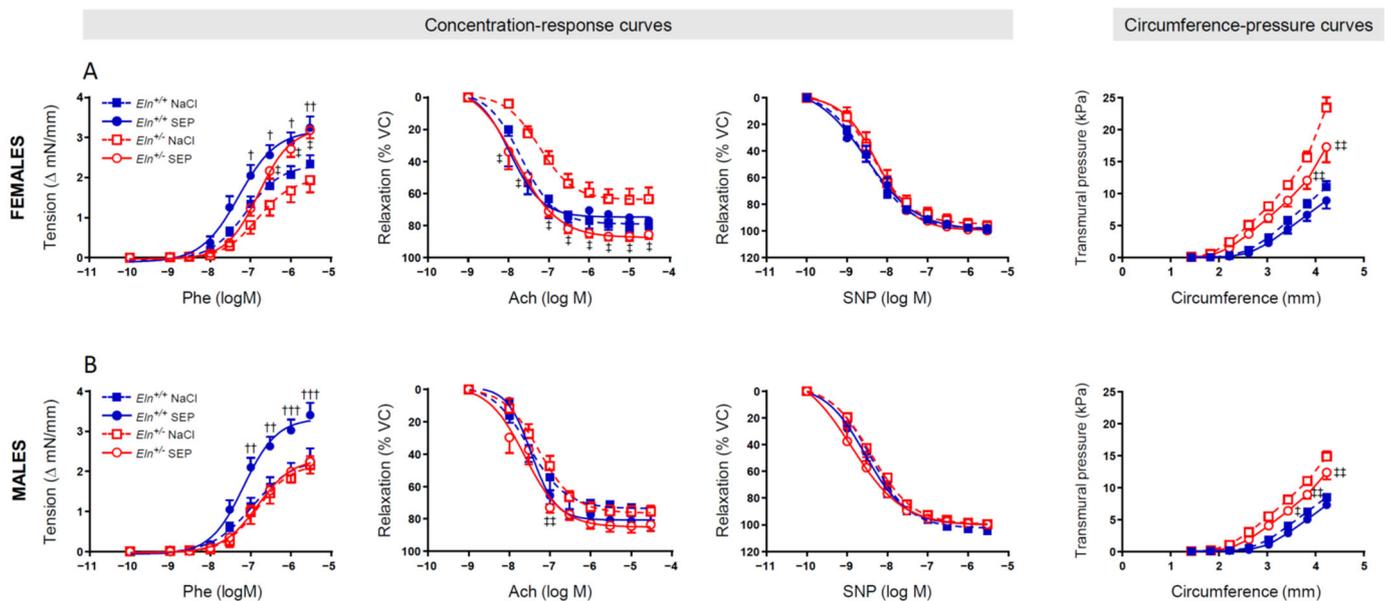


**Figure 3.** Mechanical parameters of the cannulated ascending aorta. The measurements were performed by pressure arteriography 3 days after NaCl (control) or SEP intravenous injection in the

caudal vein of male and female mice of *Eln*<sup>+/+</sup> or *Eln*<sup>+/-</sup> genotypes. (A,E) Aortic distensibility (D25)–pressure increment relation; (B,F) circumferential stress–pressure relation; (C,G) circumferential strain–pressure relation; (D,H) incremental elastic modulus (Einc)–pressure increment relation. # general significant effect of treatment (NaCl control vs. SEP), independently of genotype, sex and pressure (four-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ). Control animals were injected with the same volume of 0.9% NaCl. Values are mean  $\pm$  SEM.  $n = 7$ –10 per group.

#### 2.4. Ascending Aorta Ring Reactivity and Mechanics

The tension arteriography showed that, while mouse treatment with SEP significantly enhanced the phenylephrine (Phe)-induced vasoconstriction in *Eln*<sup>+/+</sup> mice of both sexes (at and above the Phe concentration  $10^{-7}$  M), this effect in *Eln*<sup>+/-</sup> mice was present in females only, at and above the Phe concentration  $3 \times 10^{-7}$  M. Interestingly, SEP treatment also restored the blunted acute acetylcholine (Ach)-induced relaxation observed in female *Eln*<sup>+/-</sup> mice in a wide range of concentrations, starting from  $10^{-8}$  M Ach, whereas it significantly increased the Ach-dependent vasodilatory response in male *Eln*<sup>+/-</sup> mice at the Ach concentration  $10^{-7}$  M only. No intergroup difference was observed regarding the effect of acute sodium nitroprusside (SNP)-induced relaxation (Figure 4, three left panels).

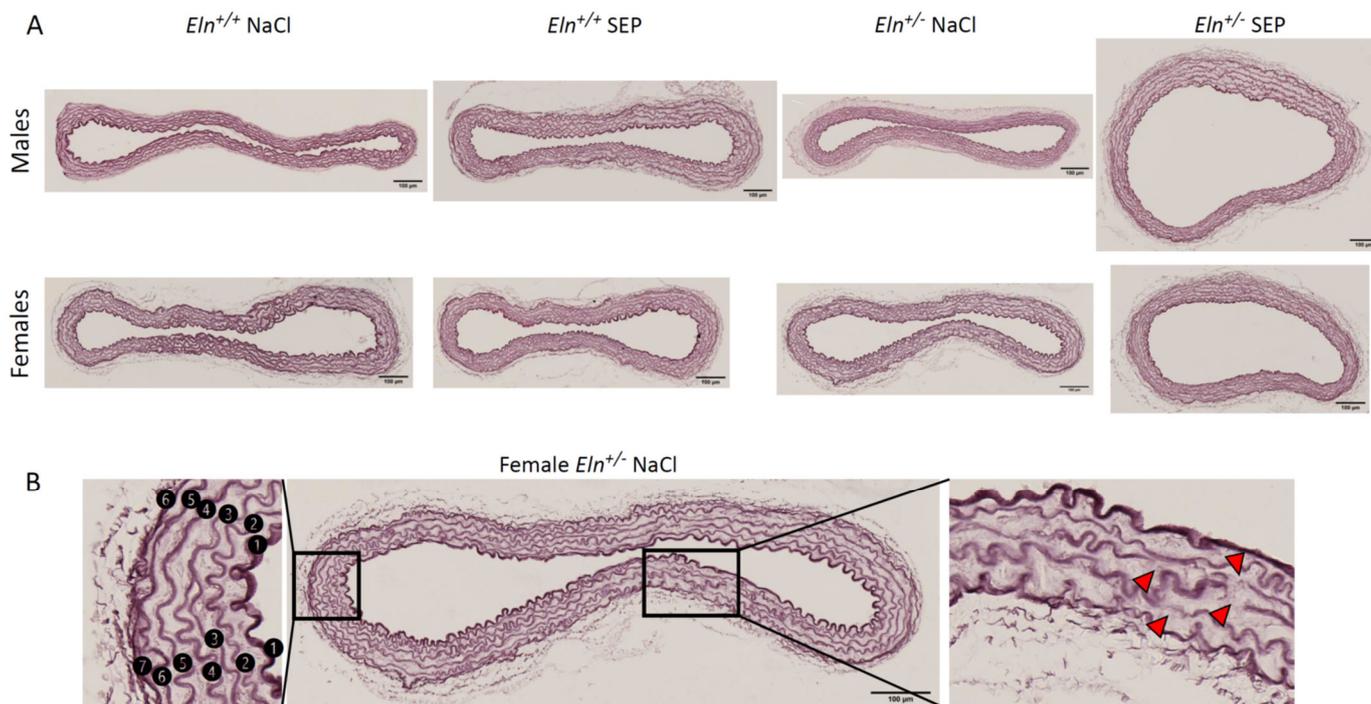


**Figure 4.** Concentration–response and circumference–pressure curves of the ascending aorta. The studies were performed by wire myography in aortae from female (A) and male (B) *Eln*<sup>+/+</sup> and *Eln*<sup>+/-</sup> mice treated with a single 0.9% NaCl (controls) or synthetic elastic protein (SEP) intravenous injection three days before the measurements. †  $p < 0.05$ , ††  $p < 0.01$  and †††  $p < 0.001$ : significant differences between *Eln*<sup>+/+</sup>SEP and *Eln*<sup>+/+</sup>NaCl; ‡  $p < 0.05$  and ‡‡  $p < 0.01$ : significant differences between *Eln*<sup>+/-</sup>SEP and *Eln*<sup>+/-</sup>NaCl (two-way ANOVAs, followed, where necessary, by multiple Bonferroni post-tests). Values are mean  $\pm$  SEM.  $n = 11$ –14 in each NaCl group;  $n = 7$ –8 in each SEP group.

The ascending aorta circumference–transmural pressure relation, indicative of arterial stiffness, was then studied. The SEP treatment did not significantly affect the circumference–pressure curves in *Eln*<sup>+/+</sup> mice, whereas it significantly reduced the transmural pressures in both female and male *Eln*<sup>+/-</sup> mice as the aortic rings were stretched to greater internal circumferences. The difference between *Eln*<sup>+/-</sup> and *Eln*<sup>+/+</sup> untreated mice persisted in animals treated with SEP (Figure 4, right panel).

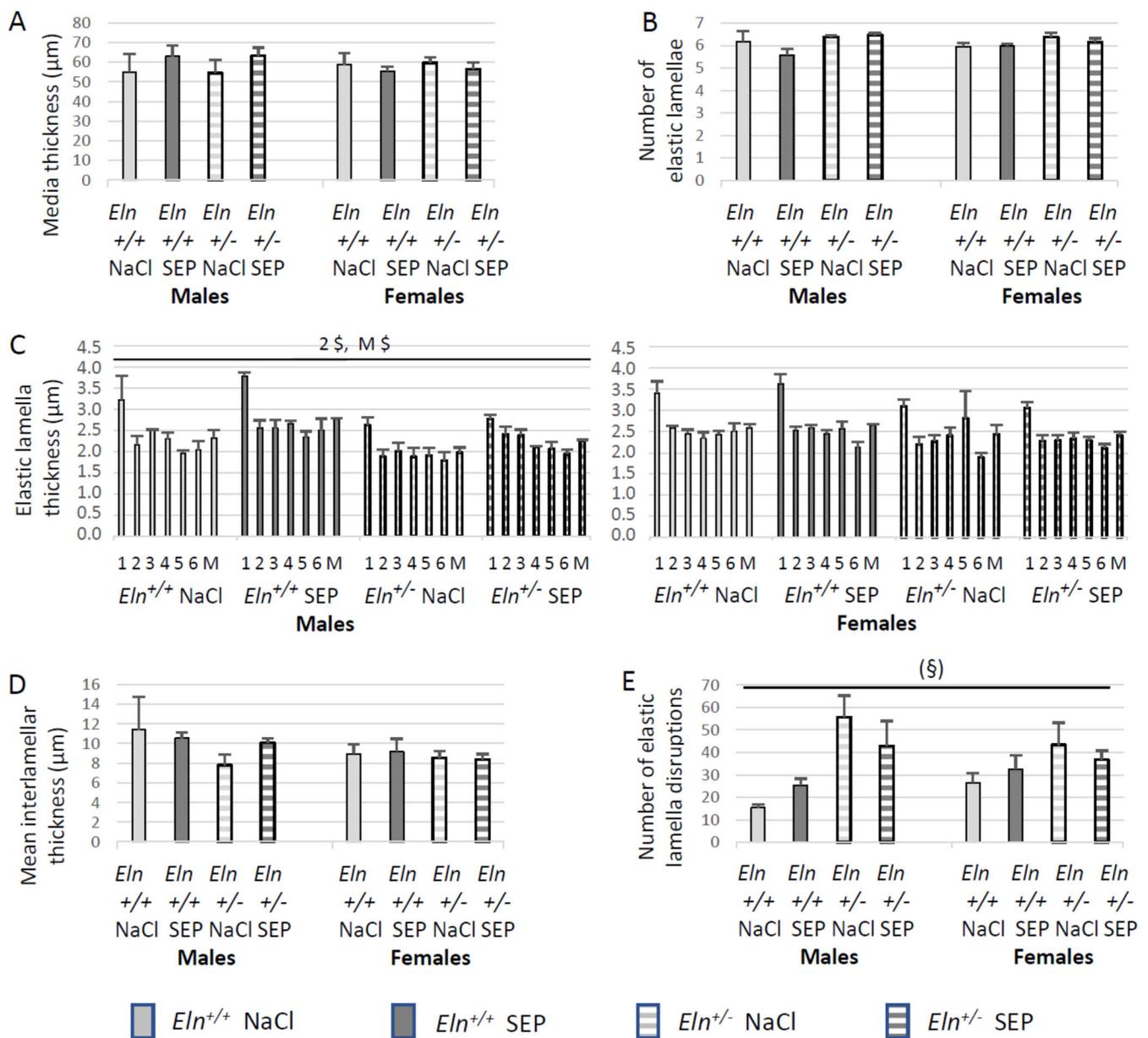
### 2.5. Aorta Morphology and Structure

Representative images of orcein-stained elastic fibers of aortae are presented in Figure 5. Histological analysis indicated that SEP treatment induced no significant difference between groups regarding the aortic media thickness, number of elastic lamellae and interlamellar thickness (Figure 6A,B,D). However, the aorta wall of SEP-treated mice presented an increase in mean lamella and lamella #2 thicknesses in male animals, not females, independently of the genotype (Figure 6C). SEP treatment also induced a strong trend ( $p < 0.08$ ) toward a reduction in the higher rate of lamella disruptions naturally present in  $Eln^{+/-}$  animals, independently of sex (Figure 6E).

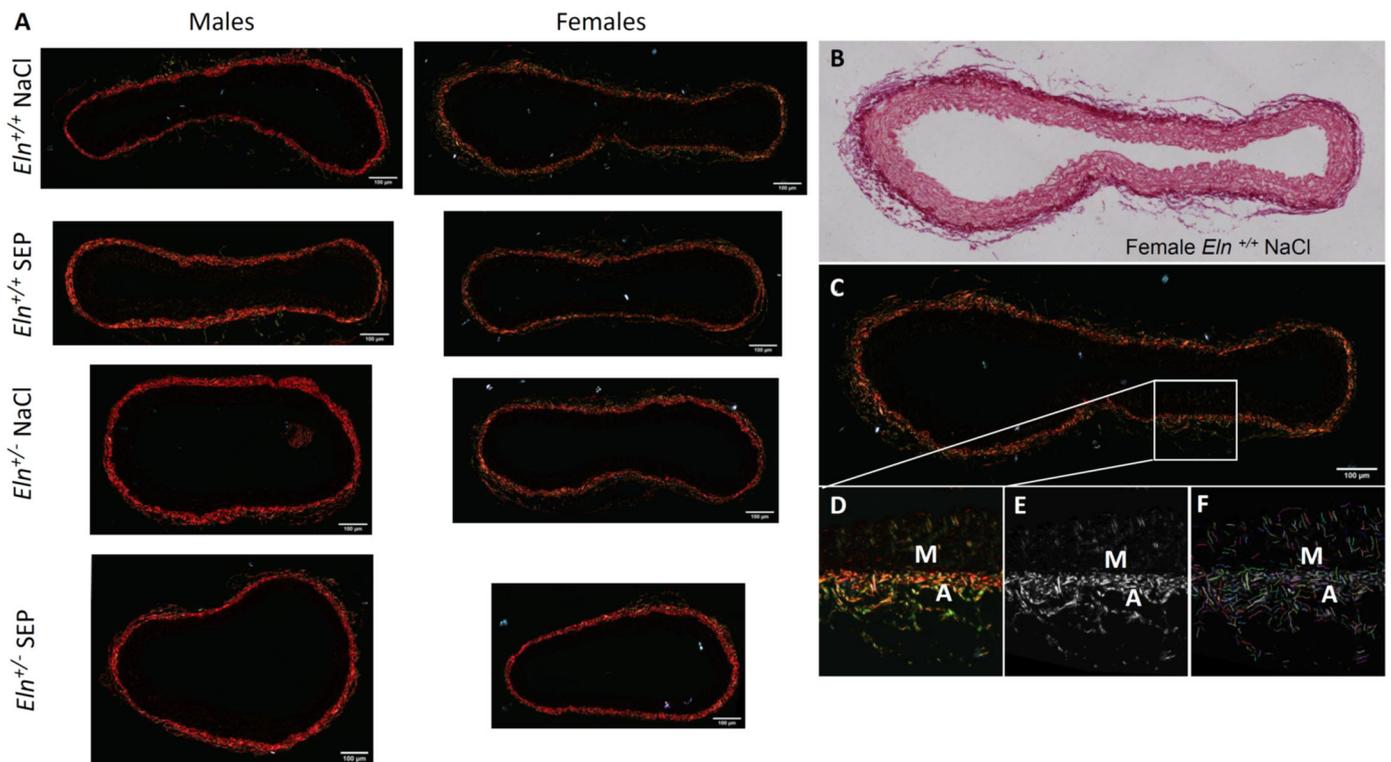


**Figure 5.** Elastic lamella detection by orcein staining in cross-sections of the distal part of the aortic arch of  $Eln^{+/+}$  or  $Eln^{+/-}$  male or female mice injected with SEP or 0.9% NaCl (control). (A) Representative images for each group. (B) Descriptive example, for an  $Eln^{+/-}$  female mouse injected with 0.9% NaCl (control), of the process used for the quantification of elastic lamella abnormalities: (i) on the left, the numbering of each elastic lamella from the luminal side (#1: Internal elastic lamina) to the external side of the media (#6 or #7, depending on the vessel), and (ii) on the right, the identification of elastic lamella disruptions (red arrowheads). Scale bars = 100  $\mu$ m.

Morphometric and quantitative analyses (curvelet transform-fiber extraction, CT-FIRE) of picosirius red-stained collagen fibers of aortae were then performed. Representative images are presented in Figure 7. No effect of SEP treatment could be observed on the collagen fiber thickness, angle and collagen fiber number per aorta section in the entire wall and media cross-sections (Figure 8A,D,E and Supplementary Materials Figure S2A,D,E) and length in the entire aorta wall only (Figure 8B). However, SEP treatment induced a collagen fiber length decrease in the aortic media of female  $Eln^{+/-}$  and an increase in female  $Eln^{+/+}$  mice, while no change could be detected in male animals (Supplementary Materials Figure S2B). The elevation of collagen fiber straightness found in the entire wall of untreated  $Eln^{+/+}$  males, compared to  $Eln^{+/-}$  female mice, was abolished by SEP treatment due to the SEP-induced increase in collagen fiber straightness in female  $Eln^{+/+}$  mice, while no impact of SEP could be detected in  $Eln^{+/-}$  animals (Figure 8C). No effect of SEP treatment on collagen fiber straightness could be observed when the analysis was restricted to the media (Supplementary Materials Figure S2C).



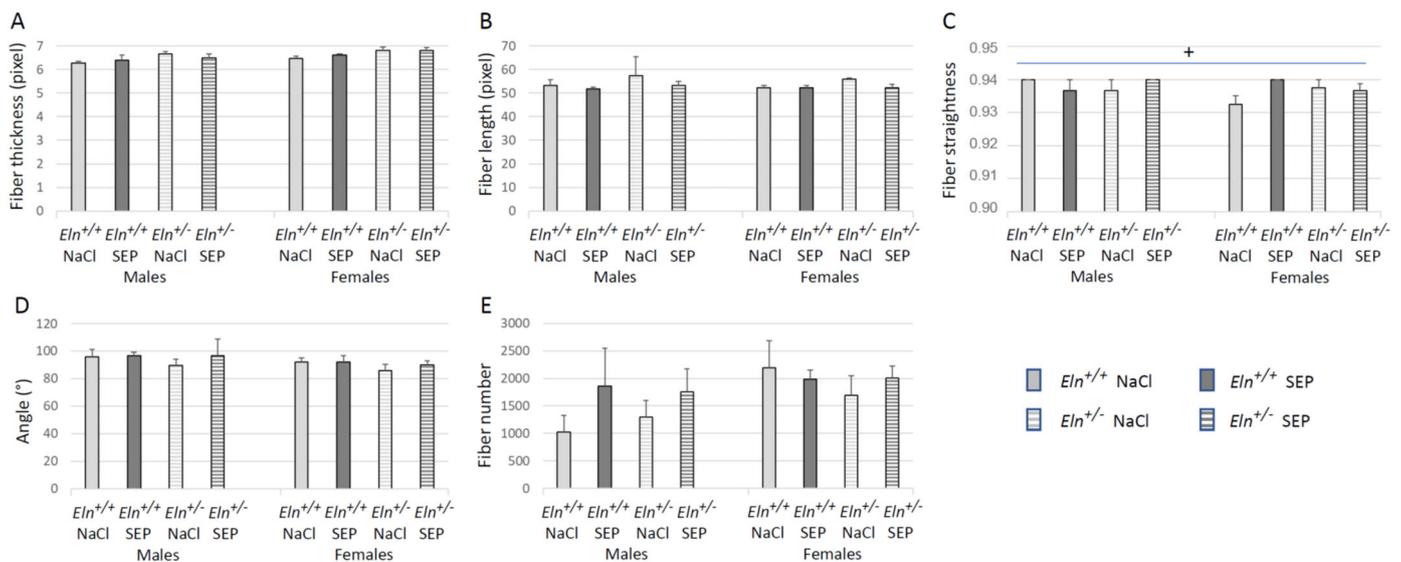
**Figure 6.** Analysis of the morphology and structure of the orcein-stained elastic fibers/elastic lamellae present in the distal part of the aortic arch, depending on genotype, sex and SEP treatment. The measurements were performed three days after NaCl (control) or SEP intravenous injection in the caudal vein of male and female mice of *Eln*<sup>+/+</sup> or *Eln*<sup>+/-</sup> genotypes. (A) Media thickness. (B) Number of elastic lamellae. (C) Mean thickness of the elastic lamellae (M) and thickness of each elastic lamellae, numbered from the luminal side of the media to the external side of the media, lamella #1 being the internal elastic lamina (see Figure 5 for illustration). (D) Mean of interlamellar thickness. (E) Number of elastic lamella disruptions. § significant interaction between sex and treatment (three-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ), showing that SEP treatment induced an increase in elastic lamella #2 thickness (2 \$) or mean elastic lamella thickness (M \$) in males, not females, independently of genotype (post hoc Fisher’s least significant difference (LSD) tests,  $p \leq 0.05$ ). (§) strong trend toward an interaction between genotype and SEP treatment, independently of sex (three-way ANOVA,  $p < 0.08$ ), suggesting a lower number of elastic lamella disruptions in *Eln*<sup>+/-</sup> mice after SEP treatment. Control animals were injected with the same volume of 0.9% NaCl (NaCl). Values are mean  $\pm$  SEM. n = 3–6 in each group.



**Figure 7.** Images of picrosirius red-stained collagen fibers in cross-sections of the distal part of the aortic arch of *Eln*<sup>+/+</sup> or *Eln*<sup>+/-</sup> male or female mice injected with SEP or 0.9% NaCl (control), illuminated with polarized light (A). Representative example of an aorta from an *Eln*<sup>+/+</sup> female mouse injected with 0.9% NaCl (B–F), under illumination with non-polarized light (B), compared to polarized light (C–F). A magnified image of the selected area of the aorta wall shown in (C) is presented in (D). The images from the whole aorta wall were then CT-FIRE-processed in order to obtain the individual fiber properties and quantity of the collagen fibers in all the studied groups (fiber width, length, straightness, angle and number of fibers in the whole aorta section). The second harmonic generation (SHG) image generated from (D) using CT-FIRE program is shown in (E). The extracted fibers obtained using the CT-FIRE program are highlighted in different colors overlaid on the original SHG image in F. M = Media, A = Adventitia. Scale bars = 100  $\mu$ m.

### 2.6. Aortic Tissue mRNA Levels

In order to have a wider view of the SEP impact on gene expressions in large elastic arteries and to save animals, the gene transcripts were measured in descending thoracic and abdominal aorta segments by RT-qPCR. First, the effects of SEP treatment were not significantly different between the thoracic and abdominal aorta segments (four-way ANOVA,  $0.29 < p < 0.85$ , depending on the gene) (Figure 9). While SEP treatment had no impact on the *Eln*, *Fbn1*, *Loxl1*, *Fbln5*, *Col1a1* and *Col1a2* mRNA levels (Figure 9A,B,D–G), SEP significantly decreased the *Lox* mRNA level in female, not male, mice, independently of the genotype and vessel segment (Figure 9C), and it generally decreased the level of *Col3a1* mRNA (Figure 9H).



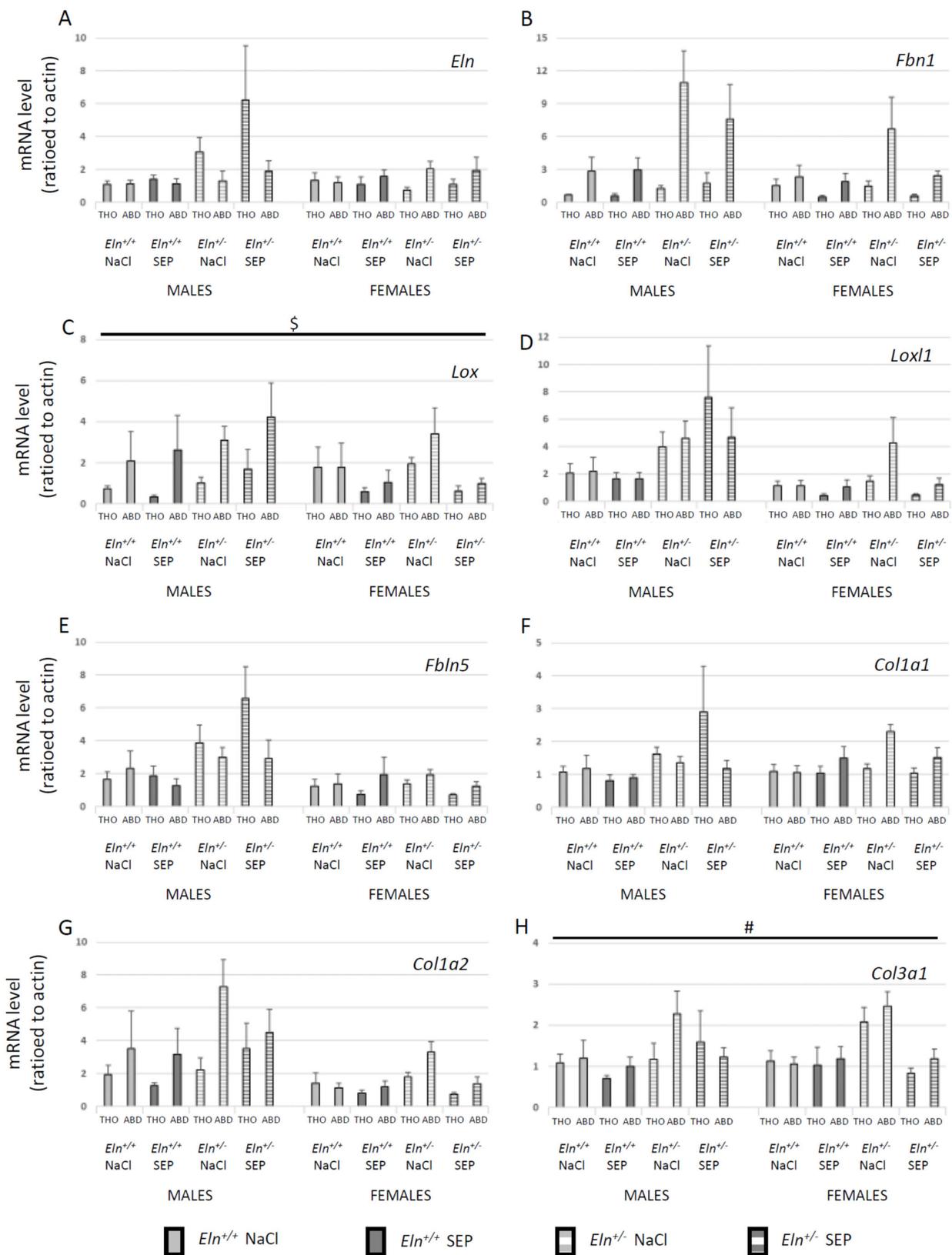
**Figure 8.** CT-FIRE analysis of picosirius red-stained cross-sections of the distal part of the aortic arch (entire aorta wall section) illuminated with polarized light. The measurements were performed 3 days after NaCl (control) or SEP intravenous injection in the caudal vein of male and female mice of  $Eln^{+/+}$  or  $Eln^{+/-}$  genotypes. Individual properties and quantity of collagen fibers were compared between the studied groups: (A) fiber thickness, (B) length, (C) straightness, (D) angle and (E) number of fibers per aorta. + significant interaction between sex, genotype and SEP treatment (three-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ), showing that the elevation of collagen fiber straightness in untreated  $Eln^{+/+}$  males, compared to  $Eln^{+/+}$  female mice, was abolished by the SEP-induced increase in collagen fiber straightness in female  $Eln^{+/+}$  mice (post hoc Fisher's least significant difference (LSD) tests,  $p \leq 0.05$ ). Control animals were injected with the same volume of 0.9% NaCl (NaCl). Values are mean  $\pm$  SEM.  $n = 3-6$  in each group.

### 2.7. Aortic Tissue Protein Levels

Western blotting of descending thoracic aorta extracts was performed for four major proteins involved in the elastic fiber structure or synthesis: TE, FBN1, LOX and immature LOX (pre-LOX). Representative images are presented in Figure 10A. SEP treatment generally decreased TE and elevated FBN1 levels (Figure 10B,C) compared to corresponding NaCl-treated controls, independently of the sex and genotype. Treatment with SEP also elevated LOX levels in females, not males, independently of the genotype, and it had no effect on pre-LOX levels (Figure 10D,E).

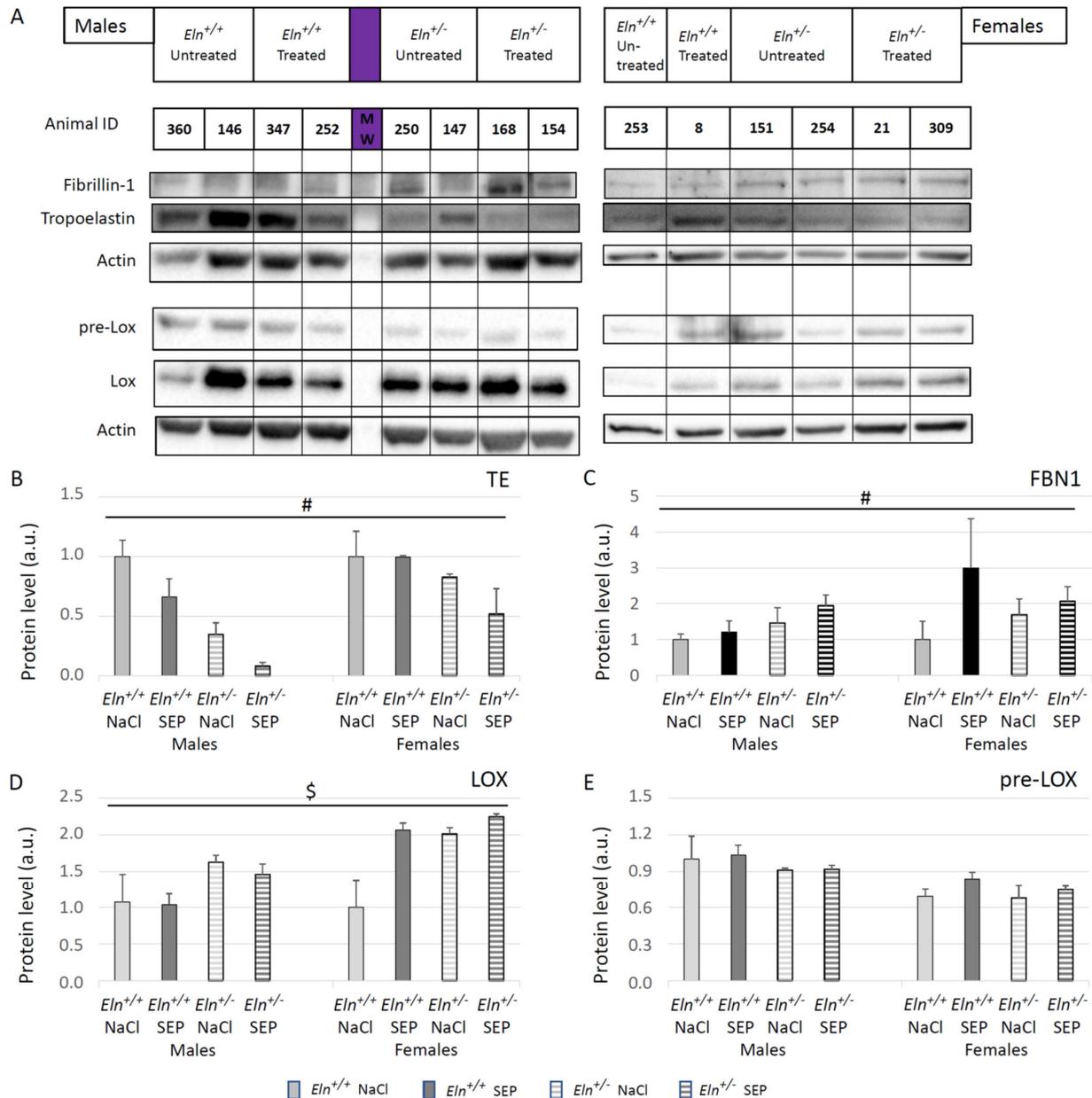
### 2.8. VSMC Proliferation and Tropoelastin Production

In order to evaluate the impact of SEP on the VSMC functions related to arterial mechanics and reactivity, we measured the cell proliferation and extracellular elastin level in primary cultures of aortic VSMCs of mice from each studied group. In  $Eln^{+/+}$  VSMCs, SEP induced a clear 21% (males)–44% (females) increase in proliferation after one day of treatment, depending on the concentration, while SEP decreased (females) or had no impact on (males) VSMCs proliferation during the following days. This biphasic effect was weak (males) or absent (females) in  $Eln^{+/-}$  VSMCs (Figure 11A).

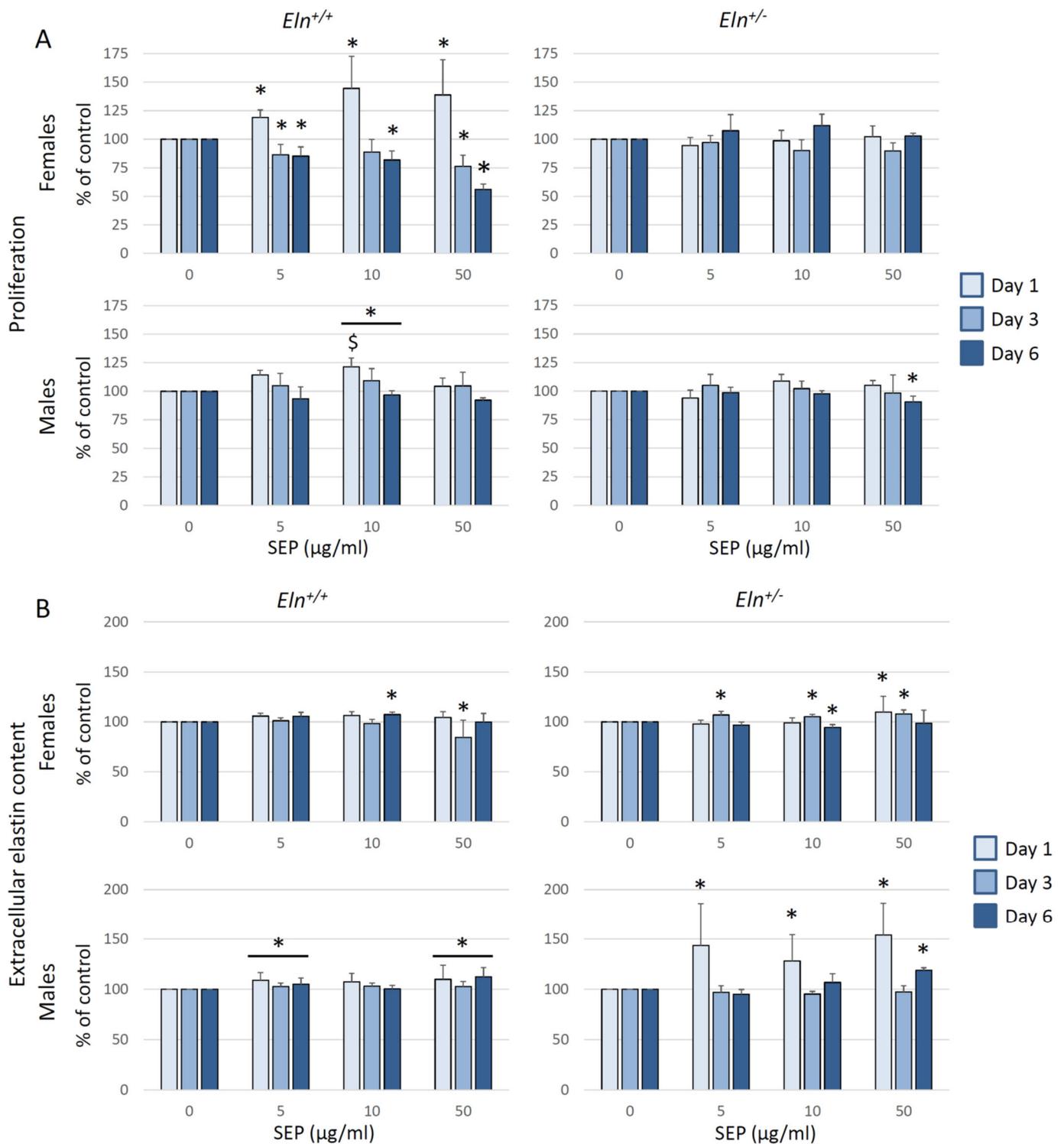


**Figure 9.** Effect of SEP treatment on the levels of mRNAs transcribed from the genes of the major components of aortic elastic and collagen fibers. The measurements were performed by RT-qPCR in thoracic (THO) and abdominal (ABD) aorta segments 3 days after SEP or NaCl (control) intravenous injection in the caudal vein of male and female mice of *Eln*<sup>+/+</sup> or *Eln*<sup>-/-</sup> genotype. (A) tropoelastin (*Eln*), (B) fibrillin-1 (*Fbn1*), (C) lysyl oxidase (*Lox*), (D) lysyl oxidase-like-1 (*Lox1*), (E) fibulin-5 (*Fbn5*), (F) type I collagen alpha-1 (*Col1a1*), (G) type I collagen alpha-2 (*Col1a2*), (H) type III collagen alpha-1

(*Col3a1*). § significant interaction between sex and SEP treatment, independently of genotype and vessel segment (four-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ), indicating that SEP significantly decreased mRNA levels in female, not male, mice (post hoc Fisher's least significant difference (LSD) tests,  $p \leq 0.05$ ). # general significant difference between untreated and SEP-treated mice, independently of sex, genotype and vessel segment (four-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ). Control animals were injected with the same volume of 0.9% NaCl (NaCl). Values are mean  $\pm$  SEM. n = 5 in each group.



**Figure 10.** Western blotting of descending thoracic aorta extracts from untreated or SEP-treated mice. (A) Representative Western blot bands for the proteins of interest in each group. Semi-quantitative analysis of the protein levels was performed by band densitometry for: (B) tropoelastin (TE), (C) fibrillin-1 (FBN1), (D) lysyl oxidase (LOX, 30kDa), (E) immature lysyl oxidase (pre-Lox, 50kDa). # general significant difference between untreated and SEP-treated mice (three-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ). § significant interaction between sex and treatment, independently of genotype (three-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ), indicating that SEP elevated the protein level in females, not males (post hoc Fisher's least significant difference (LSD) tests,  $p \leq 0.05$ ). Control animals were injected with the same volume of 0.9% NaCl (NaCl). Values are mean  $\pm$  SEM. n = 5 in each group.



**Figure 11.** Proliferation and extracellular elastin content in primary cultures of aortic VSMCs from male or female *Eln*<sup>+/+</sup> or *Eln*<sup>+/-</sup> mice. VSMCs were treated with SEP (0, 5, 10 or 50 µg/mL) for 1, 3 or 6 days. (A) Impact of SEP treatment on VSMC proliferation, evaluated by using the MTT assay. The results are expressed as percent of the control value (0 µg/mL SEP) of the same day. (B) Impact of SEP treatment on extracellular elastin content, evaluated by using an ELISA assay. The results are expressed as percent of the control value (0 mg/mL SEP) of the same day. \* significant difference with same day control (three-way ANOVA, followed by LSD test for paired comparisons,  $p \leq 0.05$ ). <sup>§</sup> significant difference at day 1 with same day control (two-way ANOVA, followed by LSD test for paired comparisons,  $p \leq 0.05$ ). Values are mean  $\pm$  SEM. n = 3–5 primary cultures from separate animals in each group.

After verification that the antibodies directed against elastin do not recognize SEP (Supplementary Figure S4), SEP was also found to induce an increase in extracellular elastin quantity in VSMC cultures from all four animal groups, although with marked variations depending on the genotype, number of days of treatment or SEP concentration. To be noted is the fact that, for a given mouse sex and genotype group, the time and SEP concentrations for which elastin overproduction was observed were those for which SEP induced no significant elevation of proliferation or a decreased proliferation of VSMCs. In females of both genotypes and *Eln*<sup>+/+</sup> males, the increase in extracellular elastin peaked in the range of +10%. In *Eln*<sup>+/-</sup> males, the elevation of extracellular elastin content was much higher and reached levels in the range of + 50% after 1 day of treatment. Only two exceptions were found in females (*Eln*<sup>+/+</sup>: day 3–50 µg/mL; *Eln*<sup>+/-</sup>: day 6–10 µg/mL), where the extracellular matrix content following SEP treatment was decreased by a few percentage points (Figure 11B).

### 3. Discussion

#### 3.1. Differences between *Eln*<sup>+/+</sup> and *Eln*<sup>+/-</sup> Mice

In the present study, we first confirmed the already demonstrated morphologically, structurally and mechanically atypical characteristics of the heart and ascending aorta of 6-month-old *Eln*<sup>+/-</sup> mice compared to their wild-type counterparts [12,18,19,25]: cardiac hypertrophy, hypertension, narrower (and thinner walled for males), longer and generally stiffened ascending aortae, although more distensible at low pressure and less distensible at high pressure, as well as more numerous, thinner and more degraded elastic lamellae. These features of *Eln*<sup>+/-</sup> mice, previously demonstrated to be present in male animals, were also shown here to be present in females. In addition, an endothelium dysfunction—i.e., decreased relaxation in response to Ach—was associated with the *Eln*<sup>+/-</sup> genotype in females, not males, in accordance with the previously observed similar response to Ach in *Eln*<sup>+/+</sup> and *Eln*<sup>+/-</sup> 6-month-old male mice [12].

#### 3.2. Impact of SEP Treatment on Blood Pressure and Heart

In this context, SEP treatment induced several modifications of the heart or aorta characteristics, with differential effects depending on the genotype or sex of the animals.

In vivo, three days after the single intravenous injection of SEP, no change in blood pressure could be detected. However, SEP increased the inner and outer diameters of the ascending aorta in *Eln*<sup>+/+</sup> mice only and mildly elevated the total heart and left ventricle weights of males, not females, compared to controls and/or females, independently of the genotype. The sex-dependent effect of SEP on heart weight is consistent with previous results, showing that (i) cardiac hypertrophy is favored by the male hormone testosterone and inhibited by the female hormone estrogens [39] and that (ii) the injected elastin peptide binding to the ERC improves the heart rate–blood pressure product (= heart work) in male rats, in a NO-dependent manner (proven post-ischemia) [40], which correlates with the left ventricle mass [41]. The moderate elevation of the heart weight observed after SEP treatment resembles the cardiac hypertrophy induced by the elastin production stimulator minoxidil in male rats and mice [26–28].

#### 3.3. Impact of SEP Treatment on Aortic Structure and Mechanics

First, in vitro, SEP increased the proliferation of aortic VSMCs from *Eln*<sup>+/+</sup>, not *Eln*<sup>+/-</sup>, mice at day 1 following treatment, while it limited cell proliferation in the following days, the latter also being true in male *Eln*<sup>+/-</sup> mice.

SEP also stimulated the production of elastin by cultured aortic VSMCs from male and female *Eln*<sup>+/+</sup> and *Eln*<sup>+/-</sup> mice, although with a substantially higher amplitude in male *Eln*<sup>+/-</sup> animals. Consistently, in vivo, SEP treatment increased the elastic lamella thickness in aortae from male, not female, animals of both genotypes. Taken together, these results suggest that the SEP-induced elastic lamella thickening could be due to elastic fiber neosynthesis, possibly accompanied by SEP integration in elastic lamellae. Both hypotheses

are consistent, at least in males, with the results related to the mechanics of the ascending aorta, which showed that the naturally increased stiffness of *Eln*<sup>+/-</sup> aortae is reduced by SEP and returns closer to the stiffness of aortae from *Eln*<sup>+/+</sup> animals. This is similar to the effect induced by minoxidil, shown in vivo to induce elastic fiber neosynthesis and aortic elasticity improvement together with cardiac hypertrophy in male rats and mice [25–28]. In addition, while the elastic lamellae from untreated *Eln*<sup>+/-</sup> animals presented substantially more disruptions than those from *Eln*<sup>+/+</sup> mice, a strong trend toward the abolition of this difference was observed following SEP treatment. Hence, this also suggests the potential of SEP for repairing the pre-existing elastic fibers, which matches the already shown protective/restorative effect on elastic fibers of minoxidil and dill extract, two stimulators of elastic fiber synthesis [25,27,28,32].

Of particular interest is the fact that SEP treatment also modified the conformation of aortic collagen fibers in female, not male, mice. In female *Eln*<sup>+/-</sup> animals, SEP injection increased the collagen fiber length (in the media) and straightness (in the entire wall), reaching the higher straightness value found in males. Therefore, this could not explain the SEP-induced increases in outer and inner diameters observed in *Eln*<sup>+/-</sup> mice of both sexes. In the aorta media of female *Eln*<sup>+/-</sup> mice, SEP treatment decreased the collagen fiber length, which has to be put in perspective with the impact of SEP treatment on the aortic mechanical and morphological properties observed in *Eln*<sup>+/-</sup> animals. In *Eln*<sup>+/-</sup> mice, the SEP-induced decrease in aortic stiffness was lower in females than males, which could partly be due to the SEP-induced decrease in collagen fiber lengths detected in *Eln*<sup>+/-</sup> females, not males.

### 3.4. Mechanisms of Action of SEP on Aortic Structure and Mechanics: Facts and Hypotheses

In order to better understand the mechanisms allowing SEP to improve aortic elasticity, we studied the tissular production of a series of gene transcripts related to collagen or elastic fibers and measured the level of the major proteins involved in elastic fiber synthesis, i.e., tropoelastin, fibrillin-1 and lysyl oxidase. In aortic segments, SEP treatment significantly decreased the *Lox* mRNA expression level in female, not male, mice of both genotypes. This effect, observed at day 3 post-SEP injection, is consistent with the absence of elastic lamella thickening in these animals, although it is concomitant with the increased LOX protein content at the same time. The latter possibly results from an earlier peak of protein production and could lead to a later elastic fiber synthesis. Further supporting the positive impact of SEP on elastic fiber neosynthesis in the mouse aorta, fibrillin-1 production was found generally elevated by SEP treatment, while, surprisingly, tropoelastin was decreased, independently of the sex or genotype. This could indicate that, at the particular timepoint chosen in our study (3 days after SEP injection), the tissular tropoelastin stocks have been used for integration in the newly synthesized elastic fibers, with no stimulation of new tropoelastin production (as suggested by the qPCR experiments) and a simultaneous overproduction of fibrillin-1. In parallel, SEP treatment induced no change in the *Col1a1* and *Col1a2* mRNA levels, as well as a general reduction in the *Col3a1* mRNA expression level, independently of the sex and genotype. The SEP-induced modifications of collagen type distribution and conformation could also account for the structural and mechanical changes observed in the aorta. This is supported by previous results, i.e., (i) changes in type I/type III collagen ratio and collagen fiber lengths correlate with a switch from normal to disease state in tissues, as shown in the heart [42], and (ii) type I collagen synthesis/degradation ratio negatively correlates with arterial stiffness [43], suggesting that a SEP-induced increase in type I/type III collagen ratio could contribute to the observed decreased aortic stiffness, in particular in *Eln*<sup>+/-</sup> animals.

The specificities of the aortic VSMCs from *Eln*<sup>+/-</sup> mice could also be involved in the modulation of arterial or cell functions by SEP, since SEP induced differential effects in *Eln*<sup>+/+</sup> and *Eln*<sup>+/-</sup> mice regarding VSMC reactivity, proliferative and synthetic functions. It was already demonstrated that VSMCs from *Eln*<sup>-/-</sup> and *Eln*<sup>+/-</sup> mice produce no (*Eln*<sup>-/-</sup>) or less (*Eln*<sup>+/-</sup>) elastin [12,18,19,44] and spontaneously hyperproliferate compared to VSMCs from *Eln*<sup>+/+</sup> animals. A similar coincidence between low elastin production and hyperpro-

liferation was also observed in cultured VSMCs from SVAS or WBS patients [45]. *Eln*<sup>-/-</sup> VSMCs return to a normal growth rate after the addition of tropoelastin, and *Eln*<sup>+/+</sup>, *Eln*<sup>+/-</sup> and *Eln*<sup>-/-</sup> VSMC proliferation is strongly reduced by rapamycin, an antiproliferative mTOR inhibitor [46,47]. Here, we showed that SEP is able to stimulate the proliferation of cultured VSMCs in *Eln*<sup>+/+</sup> mice early after treatment (day 1) and then to reduce it (days 3–6) in *Eln*<sup>+/+</sup> mice of both sexes and male *Eln*<sup>+/-</sup> animals. SEP also stimulated elastin synthesis by VSMCs at various time points and SEP concentrations, depending on the animal group, although especially in *Eln*<sup>+/-</sup> male mice, which is the group in which SEP significantly decreases arterial stiffness. The long-term (days 3–6) inhibition of VSMC proliferation by SEP resembles the previously demonstrated growth inhibition by tropoelastin of VSMCs from elastin-deficient mice 3 days after treatment [46]. Additionally, of importance is the fact that, for a given mouse sex and genotype group, the times and SEP concentrations for which elastin overproduction by VSMCs was observed were those for which SEP induced no significant elevation of proliferation or a decreased proliferation of these cells. This is consistent with previous observations showing an inverse effect of elastin peptides on chick VSMC proliferation (increase) and elastin production (decrease), probably due to the regulation of elastin production by/during cell growth [48]. These authors suggested that this effect could be mediated by the binding of elastin peptides to the elastin receptor (now known as the elastin receptor complex, ERC). The results reported here could be related to the same mechanism, since SEP includes binding sequences to the ERC, as shown by the inhibition of fibroblast adhesion onto SEP-coated surface by ERC blockade (patent #WO2017194761) [35,37,49,50]. Actually, SEP was designed to contain the same binding sites as tropoelastin regarding ERC and integrin  $\alpha v \beta 3$ , the binding of tropoelastin to integrin  $\alpha v \beta 3$  inducing cell adhesion and spreading [34]. This makes it possible/likely that one or both of these receptors is/are involved in the mechanism of action of SEP.

### 3.5. Impact of SEP Treatment on Aortic Reactivity

In addition to its differential impact, depending on the genotype, on VSMC proliferation and elastin production, SEP also acted in a genotype- and sex-dependent manner on arterial reactivity. SEP treatment increased the contractile response of the ascending aorta to acute phenylephrine (Phe,  $\geq 10^{-7}$  M) in female animals of both genotypes and male *Eln*<sup>+/+</sup> mice only. Additionally, SEP treatment restored to normal the altered vasodilatory response of female *Eln*<sup>+/-</sup> aortae to acute acetylcholine (Ach,  $\geq 10^{-8}$  M), characterizing an endothelial dysfunction in these animals, and also improved the vasodilatory response of male *Eln*<sup>+/-</sup> aortae to  $10^{-7}$  M acetylcholine only. These effects indicate a rather general SEP-induced improvement of the aortic motricity. However, the absence of enhancement by SEP of the Phe-induced vasoconstriction in male *Eln*<sup>+/-</sup> animals is puzzling and might be related to a particular regulation of the  $\alpha$ -adrenoceptor pathway by both sex/sex hormones and genotype, as previously suggested by the absence of age-dependent decline in Phe-induced vasoconstriction in male *Eln*<sup>+/-</sup> mice [12]. In the other three groups, the augmented Phe-induced aortic constriction following SEP treatment could be related to the SEP amino-acid sequences derived from tropoelastin, which are the binding sites for the ERC present at the membrane of VSMCs [35]. First, it was shown that tropoelastin application to cultured *Eln*<sup>-/-</sup> VSMCs promotes the contractile phenotype of these cells by inducing the formation of organized actin stress fibers through the mediation of the tropoelastin sequence VGVAPG, known to bind to the ERC [46,51]. This phenomenon could additionally be enhanced in the aorta of *Eln*<sup>+/-</sup> animals—here, in females, which undergo a substantially lower circumferential stress and higher stretch (or strain), since VSMCs are known to be integrin-mediated mechanical sensors in the arterial wall and regulate the actin network organization, i.e., contractile capability, as a function of wall stretch and stress [38]. The altered vasodilatory response to Ach in female *Eln*<sup>+/-</sup> mice only, possibly related to an interaction between the genotype and female hormones, is consistent with previous results showing no differential vasodilatory response to the NO-dependent vasodilator Ach between the ascending aortae from male *Eln*<sup>+/+</sup> or *Eln*<sup>+/-</sup> mice and a hyperconstricted state of renal arteries in female

*Eln*<sup>+/-</sup> mice only [12,19,52]. Since a similar vasodilatory response to the NO donor SNP, acting directly on VSMC relaxation, was observed in the four animal groups, it could be concluded that an endothelial dysfunction explains the lower response of the ascending aorta of female *Eln*<sup>+/-</sup> mice to Ach. The restoration of a normal vasodilatory response of these animals to Ach after SEP treatment could be explained by the already demonstrated endothelium- and NO-dependent vasodilatory action of elastin sequences binding to the ERC [53–56], since some of these sequences, including VGVAPG, are present in SEP.

### 3.6. Sex-Related Differences in the Response to SEP Treatment

Of particular interest are the different responses of male and female animals to the treatment with SEP. First, after inducing an initial over-proliferation of VSMCs from *Eln*<sup>+/+</sup> mice of both sexes, SEP treatment induced a delayed reduction in VSMC proliferation in females only, while virtually no sex-related difference could be detected in *Eln*<sup>+/-</sup> animals. Additionally, compared to the effects observed in female animals, SEP elevated substantially more the elastin production by VSMCs from *Eln*<sup>+/-</sup> males and induced a thickening of the elastic lamellae (#2 and mean lamella thickness) in males, independently of the genotype. This is of particular importance, since the SEP-induced decrease in aortic stiffness was of greater amplitude in male mice compared to females. This biomechanical difference is probably also related to the other SEP-induced structural changes observed in females, not males, at day 3 post-treatment, including decreased *Lox* mRNA and increased LOX protein levels (independently of the genotype), as well as increased collagen fiber straightness and length in *Eln*<sup>+/+</sup> mice and decreased collagen fiber length in *Eln*<sup>+/-</sup> animals. Unexpectedly, in *Eln*<sup>+/-</sup> mice, SEP also enhanced the Phe-induced vasoconstriction and Ach-induced vasodilation in females only, with the only exception of improved vasodilation in male *Eln*<sup>+/-</sup> animals at 10<sup>-7</sup> M Ach.

Such sex-related differences in response to SEP treatment are not surprising since, as indicated above, sex hormones have been shown to interfere with several pathophysiological mechanisms, such as cardiac hypertrophy, which is favored by the male hormone testosterone and inhibited by the female hormone estrogens [39]. A differential structural and functional impact of pharmacological treatment with minoxidil (an elastin production inducer) on arteries has also been demonstrated as a function of sex. Minoxidil was shown, in the abdominal aorta, to increase the elastin and collagen contents, decrease stiffness in females, not males, and elevate the inner diameter in males, not females [28]. Therefore, future trials should expect differential effects of SEP in males and females, which may be of importance to anticipate the precise adaptation of possible future treatments to the animal or patient sex.

### 3.7. Questions about the Presence of SEP in the Aorta Wall and Conclusions

We also tried to identify the presence of SEP in the aorta wall or, more precisely, in the elastic lamellae, in order to verify the possibility of improving arterial mechanics by direct integration of SEP in the wall or elastic lamellae. Unfortunately, the commercial antibodies to the SEP flag tag were found inoperative in immunofluorescence histology or Western blotting of mouse aortic tissues, since they revealed a supposed “SEP flag” signal in both SEP-treated and untreated animals. The design of a new strategy for SEP identification in the aortic wall will therefore be necessary, possibly by generating and injecting biotin-coupled SEP in mice. Without excluding the possibility that direct SEP integration in the aortic wall and elastic fibers could occur and participate in the observed effects, we therefore favor the second hypothesis of cellular SEP signaling to explain the SEP-induced changes in the aortae of the studied animals.

Specifically, regarding the effects of SEP in the aorta of *Eln*<sup>+/-</sup> mice, our results show a generally improved/decreased stiffness, although of higher amplitude in males, probably due to two kinds of mechanisms. First, mechanisms common for both sexes could be involved, i.e., decreased elastic lamella disruption and possibly increased type I/type III collagen ratio. Second, more sex-specific mechanisms could also contribute, such as

elastin production and elastic lamella thickening, mainly present in males, or a decrease in collagen fiber length, mainly present in females. The abolition by SEP of the altered Ach-induced vasodilation specifically present in female mice is also likely to be beneficial for the altered hemodynamics. These elements are of importance in view of the possible future treatments of SVAS/WBS patients (and possibly cutis laxa patients), a high proportion of whom present cardiovascular abnormalities similar to those observed in *Eln*<sup>+/-</sup> mice, such as hypertension, altered arterial elastic lamellae/fibers, cardiac hypertrophy or increased arterial stiffness. Treatments have to be as individualized as possible, and here, they could rely at least on sex-specific targeting of molecular effects or organ function improvements. The potential SEP treatment of patients could then be expected to be efficient regarding the improvement of the arterial elastic lamella/fiber alterations, especially in men, and elevated stiffness in both sexes, with no beneficial impact on the elevated blood pressure and a need for vigilance in male patients, since SEP treatment induced a mild cardiac hypertrophy in male animals, similar to that produced by minoxidil [27,28]. Since our in vivo results were obtained after a single injection of SEP only, future studies should verify whether a higher dose and/or multiple injections of SEP could induce an even better amelioration of the arterial function. However, our results already suggest that SEP should be considered as a tool with an interesting potential in future trials aiming at the improvement of the arterial function in human conditions related to genetic elastin deficiency.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Animals

Two hundred and twenty-one 6-month-old male and female mice (animal age between 5 and 7 months old), wild-type (*Eln*<sup>+/+</sup>) or bearing a heterozygous deletion of exon 1 in the elastin gene (*Eln*<sup>+/-</sup>, which leads to one non-functional *Eln* allele), were backcrossed for more than five generations into the C57B1/6J background and used in these experiments [18,44]. The animals were distributed into 8 groups: male or female, *Eln*<sup>+/+</sup> or *Eln*<sup>+/-</sup>, treated with SEP or untreated (control, injected with NaCl). A total of 80 animals were used to perform aortic mechanics studies, body weight/heart weight/hematocrit measurements, tissular mRNA and protein level evaluation (10 for each of the 8 groups); 80 more were used for vasoreactivity experimentations and histology (10 for each of the 8 groups); then, 43 more animals were used for blood pressure tests (5–6 for each of the 8 groups).

In addition, eighteen mice were distributed into 4 groups (male *Eln*<sup>+/+</sup>, female *Eln*<sup>+/+</sup>, male *Eln*<sup>+/-</sup>, female *Eln*<sup>+/-</sup>) and used for primary cultures of aortic VSMCs.

All animals were randomly housed in controlled conditions (temperature 21 °C ± 1 °C, humidity 60% ± 10%, lighting from 8:00 a.m. to 8:00 p.m.) and received a standard chow and tap water ad libitum.

All housing and experimental procedures were in accordance with institutional guidelines. The animal study protocols were approved by (1) the local Ethics Committee of the Université Grenoble Alpes (blood pressure measurements and all organ collections, except for tension arteriography and histology), (2) the local Ethics Committee of the Federative Structure of Research SFR BioSciences Lyon CNRS UMS3444/US8 (CECCAPP, C2EA15) (for organ collections for tension arteriography and histology) and by (3) the French ministry of research under the APAFiS numbers #20023-2019032809004121 v2 (4 July 2019) and #25475-2020050405428113\_v2 (27 May 2020), respectively.

##### 4.2. SEP Primary Structure and Production

SEP is a long polypeptide comprising 593 amino acids. It is organized as alternating hydrophobic and AK-rich cross-linking domains that mimic the native tropoelastin primary structure, preceded by a FLAG tag in its N-terminal region, as follows:

NH<sub>2</sub>CDYKDDDDK [(VGVAPGVGVLP)6AAAKAAAKAAK]6 (VGVAPGVGVLP)6-GGACLGKACGRKRK-COOH. The corresponding DNA coding sequence synthesis was outsourced to Genescript (Rijswijk, The Netherlands). The sequence was cloned in the prokaryotic expression vector pET-30a between NdeI and Sall restriction sites. The *E.coli*

BL21 (DE3) strain was transformed with the pET-30a-SEP construct under kanamycin selection. Bacteria were precultured in Luria-Bertani broth supplemented with 50 µg/mL kanamycin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), and the production was conducted in 2 L of Luria-Bertani-based auto-induction medium (Formedium, Hunstanton, UK) supplemented with 50 µg/mL kanamycin for 8 h/37 °C/150 rpm. Bacteria were centrifuged 4000× g/4 °C/20 min, and the pellet was frozen overnight at −80 °C. The pellet was thawed and resuspended in distilled water prior to mechanical cell disruption (Cell disruptor TS2, Constant Systems, Daventry, UK). The lysate was centrifuged at 10,000× g/4 °C/10 min, and the supernatant was further processed for SEP purification by the inverse transition cycling (ITC) method, as described by Meyer and Chilkoti [57]. Briefly, lysate was buffered with 50 mM Tris-HCl pH 8.8, and 0.2% polyethylenimine (Sigma-Aldrich) was added under agitation for 30 min/4 °C. The precipitate was discarded by centrifugation 15,000× g/4 °C/10 min. The supernatant was warmed to 40 °C for 10 min with 1 M NaCl prior centrifugation at 15,000× g/40 °C/5 min. The supernatant was discarded, and the pellet containing SEP was resuspended in cold buffer on ice for 10 min to end the first ITC. Three rounds of ITC were applied. The final pellet was resuspended in 0.9% NaCl. Quality controls were conducted by silver staining of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), bicinchoninic acid protein assay (ThermoFisher Scientific, Les Ulis, France), and the presence of endotoxin was quantified by limulus amoebocyte lysate testing (Endosafe, Charles River, Ecully, France). The purified SEP concentration was adjusted to 10 mg/mL in 0.9% NaCl and kept frozen at −20 °C before use.

#### 4.3. SEP Administration

After animal weighing, a single injection of 100 µL 0.9% NaCl (control) or SEP solutions was performed in the caudal vein of each animal. The injected SEP quantity was 12 µg/g. Three days after NaCl or SEP injections, all the mice were anesthetized by intraperitoneal injection of a ketamine (100 mg/kg)/xylazine (10 mg/kg) solution and heparinized (150 UI) by injection in the saphenous vein before organ collection and study by using the following methods. Another procedure, described below, was followed only in mice in which blood pressure was measured three days after saline or SEP injection.

#### 4.4. Body Weight

All the animals were weighed by using an adapted scale (precision: 0.1 g) three days after saline or SEP injection.

#### 4.5. Surgical and Post-Surgical Procedures

In order to optimize the use of the animals, we used different aorta segments depending on the technique: ascending aorta (mechanics and reactivity), distal part of the aortic arch between the left subclavian artery and the beginning of the descending thoracic aorta (histology), descending thoracic aorta (Western blots), descending and abdominal aorta (RT-qPCR) and entire aorta (cell cultures).

##### 4.5.1. Blood Pressure

In total, 43 animals, distributed into the 8 groups described above (5 per group), were studied for arterial blood pressure. Mice were anesthetized by isoflurane inhalation and had a heart rate of approximately 400–450 beats per minute (bpm). Isoflurane was administered with a vaporizer (MSSVAP02, Medical Supplies and Services International limited, Keighley, UK). After induction with 2.5–3.5% isoflurane in an isolated chamber, mice were placed on a heating table to maintain body temperature at 37 °C. Anesthesia was maintained with 1–1.5% isoflurane (with mix air/O<sub>2</sub> flow 0.5/0.5 L/min) delivered through a small nose cone. A polyethylene catheter filled with a heparinized saline solution connected to a pressure probe and an acquisition system Powerlab 26T (AD instruments, Dunedin, New Zealand) and acquisition software Labchart (AD instruments) was inserted

into the left carotid artery. Systolic, diastolic and mean arterial blood pressures, as well as heart rate, were measured for a period of time (2–5 min) during which the signal was stable.

#### 4.5.2. Heart Weight and Hematocrit

Under anesthesia, the hearts were then collected, washed and weighed (wet weight). The left ventricle and septum were then dissected, washed and separately weighed (wet weight). Total heart weight to body weight (HW/BW) and left ventricle + septum weight to body weight (LV + S/BW) ratios were calculated as percentages. During this procedure, some blood from each animal was collected in hematocrit tubes, and the hematocrit was read after tube centrifugation.

#### 4.5.3. Cannulated Ascending Aorta Mechanics—Pressure Arteriography

The ascending aorta was excised and placed in a physiological buffer composed of 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.6 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.17 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.6 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5.5 mM D-glucose, 0.025 mM EDTA, 10 mM HEPES (pH 7.4). The vessels were then cannulated and mounted onto a pressure myograph placed under a video microscope, allowing for aorta bathing and filling with the physiological solution at 37 °C. A proprietary video analysis software system, WinDiam, coupled to the video microscope, was used to measure the inner (ID) and outer (OD) vessel diameters while changing the intraluminal pressure of the vessel, i.e., changing the pressure of the physiological buffer filling the vessel lumen from 0 to 175 mmHg [12,58]. Below 125 mmHg, where the ascending aorta wall is too thick to allow for accurate measurement of the transilluminated vessel ID, ID was calculated as described in Ref [58]. Distensibility, i.e., the relative change in luminal volume (percentage) per mmHg, was then calculated. Here, we used the distensibility per 25 mmHg increment (D25). The circumferential midwall strain ( $\epsilon$ ), circumferential wall stress ( $\sigma$ ) and incremental elastic modulus (Einc) were calculated according to classical formulae [59].  $\epsilon$  is the relative increase in diameter at a given pressure compared to the diameter at no pressure.  $\sigma$  are the forces, which are circumferentially applied on each small portion of the vessel wall. Einc is indicative of wall stiffness. The detailed protocol is described in Appendix A.1.

#### 4.5.4. Ascending Aorta Length, Ring Reactivity and Mechanics—Tension Arteriography

Mice were anesthetized with ketamine (200 mg/kg, i.p.) and xylazine (20 mg/kg, i.p.). The ascending aorta (from the sinotubular junction of the aortic root to brachiocephalic artery) was removed rapidly and placed in a cooled physiological saline solution (PSS) bubbled with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. After cutting and measuring the length by using a digital microscope, the vessels were transferred into the chambers of a Multi Wire Myograph (Model 610M; Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Denmark) filled with PSS at 37 °C (pH 7.4). The aorta ring was mounted onto two pins (200  $\mu$ m diameter). The effective pressure was normalized by the stretching of the aorta, reaching a tension corresponding to the target pressure of 100 mmHg (IC100). Then, the aorta was set to a distension corresponding to 90 mmHg (90% of IC100). At this resting pressure, the aortic rings were pre-contracted with 60 and 120 mM KCl, successively [60]. After a 30 min equilibration period at resting pressure, the cumulative concentration–response curves of phenylephrine (Phe,  $1 \times 10^{-9}$  to  $3 \times 10^{-6}$  M), acetylcholine (Ach,  $1 \times 10^{-8}$  to  $3 \times 10^{-5}$  M) and sodium nitroprusside (SNP, a NO donor inducing endothelium-independent and VSMC-dependent vasodilation,  $1 \times 10^{-9}$  to  $3 \times 10^{-6}$  M) were consecutively studied, as previously described [60]. Vasoconstriction was expressed as the changes of tension ( $\Delta$ mN/mm vessel length). Relaxation was evaluated in vessels pre-contracted with Phe inducing 40–60% of maximal vasoconstriction and was calculated as the percentage of reversal of the Phe-induced vascular tone. At the end of the vascular reactivity study and after a 15 min period of equilibration, the aortic rings were gradually stretched by 200  $\mu$ m steps using a micrometric expander. In response to stretching, the internal circumference increased, leading to an elevation of transmural pressure, expressed in kPa.

#### 4.5.5. Histological Staining and Image Analysis

For histological analyses, the distal part of the aortic arch (between the left subclavian artery and the beginning of the descending thoracic aorta) was fixed with formalin and embedded in paraffin (FFPE), then cut into 5  $\mu\text{m}$  thick sections. Staining was performed after dewaxing and rehydration up to water.

##### Elastic Fiber Staining—Orcein Acid (According to Shikata's Method)

Orcein staining was carried out by immersing aortic sections for 30 min in a commercial solution of acid orcein (#010251, Diapath, Martinengo, Italy) [61,62]. The slides were then rinsed for 5 min in different solutions (70% EtOH, then distilled water, 100% EtOH for 5 min, EtOH/HCl (99.5/0.5, *v/v*) and then running tap water). Counterstaining was then performed for 5 min using Hematoxylin counterstain solution (#H-3401-500, Vector Laboratories, Newark, CA, USA), and the sections were then rinsed in running tap water. No counterstaining was performed in the sections used for elastic lamella number and disruptions in order to facilitate the quantifications. After dehydration, sections were mounted in an organic mounting medium (BioMount DPC, Biognost, Zagreb, Croatia) and scanned using the AXIO SCAN.Z1 slide scanner (Zeiss, Rueil Malmaison, France).

##### Collagen Fiber Staining—Picrosirius Red

Rehydrated tissue sections were stained for 1 h with Sirius Red F3B (Direct Red 80, #365548, Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France) solution at 1 g/L in saturated aqueous solution of picric acid (1.3%). After 2 quick washes in 0.5% acidified water, the sections were dehydrated, mounted and scanned using the AXIO SCAN.Z1 slide scanner (Zeiss) under brightfield and linear polarized filters, as birefringence under polarized light is highly specific for collagen [63]. The birefringent images of the aorta sections, captured at 90°, were analyzed through the curvelet transform–fiber extraction (CT-FIRE) analysis for fiber length, thickness, density, straightness, angle and alignment between collagen fibers using the CT-FIRE V3.0 Beta software, as described previously [64–67].

#### 4.5.6. mRNA Level Analyses—RT-qPCR

##### DNA and RNA Extraction

For RNA extraction, abdominal and descending thoracic aortae were homogenized in TRIzol Reagent (#15596026, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and RNA was extracted after precipitation with isopropanol and ethanol washes according to the manufacturer's protocol. RNA samples were stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  after flash-freezing in liquid nitrogen.

##### Reverse Transcription and Quantitative Real Time PCR Analysis

One microgram of RNA was reverse-transcribed to cDNA using the iScript complementary DNA (cDNA) synthesis kit (#1708840, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), according to the manufacturer's protocol. cDNA or DNA were used for quantitative real-time PCR (RT-qPCR) using the SsoAdvanced SYBR Green Supermix kit (#1725270, Bio-Rad Laboratories), according to the manufacturer's protocol. Gene expression was normalized to beta actin. The genes of interest were: *Eln* (tropoelastin), *Fbn1* (fibrillin-1), *Lox* (lysyl oxidase), *Loxl1* (lysyl oxidase-like-1), *Fbln5* (fibulin 5), *Col1a1* (type I collagen alpha-1), *Col1a2* (type I collagen alpha-2), *Col3a1* (type III collagen alpha-1). The primer sequences used for analyses are listed in Appendix A.2.

#### 4.5.7. Western Blots

A snap-frozen descending thoracic aorta was homogenized in 200  $\mu\text{L}$  RIPA buffer (Tris HCl, pH 8 (50 mM) final, NaCl (150 mM) final, NP40 (1%) final, DOC (sodium deoxycholate) (0.5%) final, SDS (0.1%) final, Proteases inhibitor  $1\times$  final, PMSF (1 mM) final) and lysed using ceramic beads with a Precellys 24 (6000 rpm,  $3\times 10\text{ s}$ ) or 300  $\mu\text{L}$  RIPA buffer in Polytron to extract the proteins. The lysate was centrifuged at  $9500\times g$  at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 10 min, and the supernatant was centrifuged again at  $9500\times g$  at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 10 min before the

collection of the supernatant. The protein concentration was calculated by using a Bradford assay using bovine serum albumin (BSA) as a standard, according to the manufacturer's protocol (Bradford reagent, #5000006, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Amounts of 15–20 µg of proteins were separated by electrophoresis on 8% (fibrillin-1, tropoelastin) or 12% (lysyl oxidase) SDS polyacrylamide gels for 20 min at 80 V, then for 1 h 20 min–2 h at 120 V, and transferred to polyvinylidene difluoride membranes and nitrocellulose membranes. Next, the membranes were blocked for 1 h at room temperature with 5% nonfat milk (tropoelastin) or 5% BSA (fibrillin-1, lysyl oxidase) in TRIS-buffered saline (TBS) with Tween 20 (0.1%). Membranes were then incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies in TBS-Tween 20–1% nonfat milk or BSA: anti-tropoelastin (1/1000, PR385, Elastin Products Company, Owensville, MO, USA), anti-fibrillin-1 (1/1000, Ab53076, Abcam, Cambridge, UK), anti-lysyl oxidase (1/1000, D8F2K, Cell signaling, Danvers, Massachusetts). Membranes were then incubated for 1 h at room temperature with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated anti-IgG (anti-rabbit 1/5000, #111-035-003, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) before and after three washes in TBS, Tween 0.1%. The proteins were visualized by enhanced chemiluminescence with the Western Blot ECL substrate (Clarity, Bio-Rad) on a ChemiDoc analyser (Bio-Rad). The relative amount of protein was quantified by densitometry (Image Lab, Bio-Rad) and expressed as a ratio of the actin content.

#### 4.6. Proliferation and Elastin Production by Cultured VSMCs

##### 4.6.1. Primary Cell Cultures

As previously described, VSMCs were isolated from the entire aorta of eighteen mice ( $Eln^{+/+}$  and  $Eln^{+/-}$ , males and females). For each cell culture, one aorta was enzymatically digested with collagenase type 2 (1 mg/mL) for 30 min at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. The adventitia was then mechanically removed, and the remaining medial + intimal tube cut in 2 mm long pieces was digested with collagenase type 2 (1 mg/mL) and elastase (0.5 mg/mL) for 40 min at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, before mechanical trituration by continuous flushing with a pipetter for 10 min. The suspension was centrifuged at 200× *g* for 10 min, and the cells were collected and seeded in a well from a 24-well plate in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), containing 20% bovine fetal serum (FBS), 1% (*v/v*) penicillin/streptomycin solution and 1% non-essential amino acids solution (NEAA), and maintained in 5% CO<sub>2</sub> humidified air at 37 °C. At sub-confluency, cells were isolated by trypsinization, and the cell culture was amplified and used at the 6th or 7th passage.

##### 4.6.2. VSMC Proliferation—MTT Assay

The MTT assay was used to measure cellular metabolic activity as an indicator of proliferation. This colorimetric assay is based on a reduction of yellow tetrazolium salt (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide or MTT) to purple formazan crystals by the metabolically active (= living) cells only. The viable cells contain NAD (P)H-dependent oxidoreductase enzymes, which reduce the MTT to formazan. VSMCs were cultured in 96-well plates in fresh 20% FBS-DMEM supplemented with 0, 5, 10 or 50 µg/mL SEP. Because in cell cultures, SEP does not potentially undergo a loss of potency due to *in vivo* metabolization, the SEP concentrations used for cultured VSMC treatment were lower than those used for intravenous injection in mice. After 1, 3 or 6 days, the cells were incubated for 4 h at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> with 15 µL Dye solution (cat. #G4101, Promega, Madison, WI, USA). Then, the insoluble formazan crystals were dissolved using 100 µL solubilization solution (cat. #G4102, Promega, Madison, WI, USA) for 1 h at room temperature; then, they were homogenized using a pipette, and the resulting colored solution was quantified by measuring the absorbance at 560 nm with a multi-well spectrophotometer (1681000, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). The cell culture medium was replaced on day 3 by a fresh medium (containing SEP or not, depending on the case), allowing for the continuation of the experiment until day 6.

#### 4.6.3. Extracellular Elastin Quantification—ELISA Assay

As previously described [28], VSMCs were cultured in 96-well plates in fresh 1% FBS-DMEM until they reached total confluency. They were then bathed in 1% FBS-DMEM supplemented with 0, 5, 10 or 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  SEP. After 1, 3 or 6 days, the wells were washed three times with 0.1% Tween-containing PBS 1X, and VSMCs were exposed to the primary antibody to elastin (1:1500; 100  $\mu\text{L}/\text{well}$ , 1 h, 37 °C) (ab21610, Abcam, Paris, France) before application of the secondary anti-rabbit antibody (1/5000, 100  $\mu\text{L}/\text{well}$ , 1 h, 37 °C) (cat. #111-035-003, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) coupled to horseradish peroxidase (HRP). After triple washing with 0.1% Tween-containing PBS 1X, this was followed by addition of 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  substrate of HRP, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, cat#T0440, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) for 30 min at room temperature, the reaction being stopped by the addition of sulfuric acid (1M). After 10 min, the reaction end product was then quantified by measuring its absorbance at 450 nm with a multi-well spectrophotometer (1681000, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

#### 4.7. Statistical Analysis

Regarding the experiments other than aorta ring mechanics, reactivity and length, the statistical comparisons were performed by using two-, three- or four-way ANOVAs, followed, where necessary, by Fisher's least significant difference (LSD) tests for paired value comparisons. The software used were Statistica 6.1 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) and GraphPad Prism 4 (GraphPad Software. Inc., San Diego, CA, USA).

For aortic ring mechanics/reactivity, the concentration–response curves were fitted to a sigmoidal logistic equation using GraphPad Prism 4 (GraphPad Software. Inc., San Diego, CA, USA). The concentration–response curves and internal circumference–pressure curves were analyzed using two-way ANOVAs, followed by multiple Bonferroni post-tests. Unpaired t-tests were also used for comparison of the ascending aorta lengths.

The results are presented as mean values  $\pm$  SEM, and  $p$ -values  $\leq 0.05$  were considered statistically significant.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms232113464/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, R.D., G.F., E.L. (Elise Lambert), M.L. and K.-L.L.; methodology, R.D., G.F., E.L. (Elise Lambert), M.L., K.-L.L. and J.G.; investigation, Q.B., M.L., K.-L.L., G.V., O.H., A.C., E.L. (Emeline Lemarié), M.R., I.S., S.B., A.D., A.B.-P., N.E.K., A.B., A.B.-M., E.L. (Elise Lambert), R.D. and G.F.; writing—original draft preparation, Q.B., R.D., G.F., E.L. (Elise Lambert), M.L. and K.-L.L.; writing—review and editing, Q.B., R.D., G.F., E.L. (Elise Lambert), M.L., K.-L.L., A.B.-M. and J.-L.P.; supervision, R.D. and G.F.; funding acquisition, R.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR, France, grant # ANR-18-CE18-0001), Association Autour des Williams (France), Société Française de Cardiologie (France, fellowship to Q.B.).

**Institutional Review Board Statement:** The animal study protocols were approved by (1) the local Ethics Committee of the Université Grenoble Alpes (blood pressure measurements and all organ collections, except for tension arteriography and histology), (2) the local Ethics Committee of the Federative Structure of Research SFR BioSciences Lyon CNRS UMS3444/US8 (CECCAPP, C2EA15) (for organ collections for tension arteriography and histology) and by (3) the French ministry of research under APAFiS numbers #20023-2019032809004121 v2 (4 July 2019) and #25475-2020050405428113\_v2 (27 May 2020), respectively.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data are not publicly archived. Data analyzed and generated during the study are available from the corresponding author G.F. on reasonable request.

**Acknowledgments:** We acknowledge the contribution of the histology and imaging facility (PrimaTiss) at the LBTI institute for the histological analyses of aortae and of Federative Structure of

Health Research Lyon-Est CNRS UMS3453/INSERM US7 and particularly Bruno CHAPUIS from the microscopy platform (CIQLE) for his advice regarding slide scanning and imaging analysis. We also acknowledge the contribution of the animal facility UMS hTAG (CNRS UAR2019, Inserm UMS46, Université Grenoble Alpes).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; the collection, analyses, or interpretation of data; the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## Appendix A

### Appendix A.1

#### Detailed Surgical Procedure and Methods for Mechanical Study of Cannulated Aortae

Animals were anaesthetized by intraperitoneal injection of a ketamine (100 mg/kg)/xylazine (10 mg/kg) solution, and an injection of heparin (90 units/30 g) was performed in the saphenous vein. The ascending aorta was quickly excised and placed in a physiological buffer (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.17 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.6 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.6 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 5.5 mM D-glucose, 0.025 mM EDTA, 10 mM HEPES; pH = 7.4). The vessels were cleaned of the adhering connective tissue and fat, then cannulated and mounted onto a pressure arteriograph, as described previously [12,58]. The pressure arteriograph was composed of a plexiglass organ bath (filled with 10 mL physiological buffer), surrounded by a water jacket for heat regulation, in which two aligned cannulae (diameter: ~1 mm) were supported by holders. Each cannula was ligatured to one end of the ascending aorta, while the opposite end of the cannula was connected to a small tube joining a reservoir filled with physiological buffer, also allowing for changes of the pressure in the tubing and vessel. A verification of the absence of physiological buffer leakage (because of the wrong ligation or presence of a small hole in the vessel) upon pressurization of the vessel was then performed prior to starting the experiments. The experiments were performed at 37 °C, and the physiological buffer present in the bath and the vessel was replaced every 15 min. Following a 30 min equilibration period, the vessel was transilluminated under an inverted microscope connected to a charge-coupled device camera and a computer. The proprietary software Windiam allowed for the continuous detection of the vessel's inner and outer borders on the images from the camera (2 images/s) and recording of the vessel's diameters [12]. Recordings of vessel inner diameters (IDs) and outer diameters (ODs) were taken while increasing the intravascular (transmural) pressure from 0 to 175 mmHg by steps of 25 mmHg (5 min per step). The inner diameter was directly measurable by transillumination at and above 125 mmHg because of the thinning of the vessel wall due to increasing pressure-induced dilatation, allowing a clear and contrasted image of the inner wall edge. At lower pressures, as previously described, the inner diameter can be accurately calculated through the entire range of pressures tested from the measured OD and a unique measurement of the vessel wall cross-sectional area (WCSA). As previously described [19,58], assuming that the WCSA is constant, the formula finally used to calculate ID was

$$ID_{x \text{ mmHg}} = \sqrt{(OD_{x \text{ mmHg}}^2 - OD_{175 \text{ mmHg}}^2 + ID_{175 \text{ mmHg}}^2)} \quad (A1)$$

Distensibility is defined as a change in the relative volume (percentage) of the lumen per pressure unit during a change in the intravascular pressure, as described by Smith and Kampine [68]. Distensibility (D), in percent, is

$$D = 100(\Delta V / V_A) / \Delta P \quad (A2)$$

V<sub>A</sub> is the luminal initial volume before a small change in pressure. ΔV is the luminal volume change (V<sub>A</sub> to V<sub>B</sub>) in response to a change in transmural pressure (from pressure A

to B). The luminal volume of a given constant length (L) of a vessel segment is  $L \cdot \pi \cdot ID^2 / 4$ . Therefore

$$D = 100 [(L \pi \Delta(ID^2_B/4)) / (L \pi ID^2_A/4)] / \Delta P \quad (A3)$$

$$D = 100(\Delta(ID^2_B)/ID^2_A) / \Delta P = 100 [(ID^2_B - ID^2_A) / ID^2_A] / \Delta P \quad (A4)$$

Since the pressure change increment in our experiments was 25 mmHg, we replaced, in the following sections, the distensibility (% change in volume per 1 mmHg) by distensibility per 25 mmHg increment (D25). In any pressure range, a 25 mmHg pressure change between pressure X mmHg and pressure X + 25 mmHg leads to the following expression of D25.

$$D25 = 100(ID^2_{X+25} - ID^2_X) / ID^2_X \quad (A5)$$

The circumferential midwall strain and circumferential wall stress were calculated according to the formulae given by Gibbons and Shadwick [59]:

Circumferential midwall strain ( $\epsilon$ )

$$\epsilon = \Delta R / R_0 = (R - R_0) / R_0 \quad (A6)$$

where R is the midwall radius ( $R = (OD + ID) / 4$ ), and R0 is the midwall radius at no transmural pressure (0 mmHg).

Circumferential wall stress ( $\sigma$ )

$$\sigma = (P \times r) / h \quad (A7)$$

where P is the pressure (in kPa), r is the luminal radius ( $= ID / 2$ ), and h is the wall thickness.  $\sigma$  represents the forces that are circumferentially applied to each small portion (surface) of the vessel wall because of the intraluminal pressure-induced stretching of the vessel.

The incremental elastic modulus (Einc, 25 mmHg increments) represents the stiffness of the arterial wall material:

$$E_{inc} = 0.75 (1 + \epsilon) \Delta \sigma / \Delta \epsilon \quad (A8)$$

1 kPa is assumed to be equal to 7.5006 mmHg.

## Appendix A.2

The primers used in RT-qPCR studies were as follows:

mRNA	Forward Primer (5'–3')	Reverse Primer (5'–3')
collagen type I, alpha 1 ( <i>Col1a1</i> )	GCGAAGGCAACAGTTCGATTC	CCCAAGTTCGGTGTGACTC
collagen type I, alpha 2 ( <i>Col1a2</i> )	CAAGCATGTCTGGTTAGGAGAG	AGGACACCCCTTCTACGTTGT
collagen type III, alpha 1 ( <i>Col3a1</i> )	CAGCTGGCCTTCCTCAGACTT	GCTGTTTTGCAGTGGTATGTAATG
fibrillin1 ( <i>Fbn1</i> )	TGCCAGCAGCGAGATGGACGA	TGGCGAGGCTCACGTTGGCTT
fibulin 5 ( <i>Fbln5</i> )	TTGAGGAAGATGGCATTCACT	GGCTGGTTCACACACTCGT
lysyl oxidase ( <i>Lox</i> )	AATTCAGCCACTATGACCTGCTTGA	GTAGCGAATGTCACAGCGTACAACA
lysyl oxidase-like-1 ( <i>Loxl1</i> )	TATGCCTGCACCTCTCACAC	TGTCCGCATTGTATGTGTCAT
tropoelastin ( <i>Eln</i> )	AAGCTGCTGCTAAGGCTGC	TGCAACTCCTCCACCTGGGAA

A: adenine, C: cytosine, G: guanine, T: thymine.

## References

1. Tucker, W.D.; Mahajan, K. Anatomy, blood vessels. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2019.
2. Greenwald, S.E. Ageing of the Conduit Arteries. *J. Pathol.* **2007**, *211*, 157–172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. O'Rourke, M.F.; Hashimoto, J. Mechanical Factors in Arterial Aging: A Clinical Perspective. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2007**, *50*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Chapter 7: The Cardiovascular System: Blood Vessels and Circulation—Anatomy & Physiology. Available online: <https://qut.pressbooks.pub/anatomyandphysiology/chapter/chapter-20-the-cardiovascular-system-blood-vessels-and-circulation/> (accessed on 18 May 2022).
5. Behmoaras, J.; Osborne-Pellegrin, M.; Gauguier, D.; Jacob, M.-P. Characteristics of the Aortic Elastic Network and Related Phenotypes in Seven Inbred Rat Strains. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2005**, *288*, H769–H777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Leung, D.Y.; Glagov, S.; Mathews, M.B. Elastin and Collagen Accumulation in Rabbit Ascending Aorta and Pulmonary Trunk during Postnatal Growth. Correlation of Cellular Synthetic Response with Medial Tension. *Circ. Res.* **1977**, *41*, 316–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Wolinsky, H.; Glagov, S. Structural Basis for the Static Mechanical Properties of the Aortic Media. *Circ. Res.* **1964**, *14*, 400–413. [[CrossRef](#)]
8. Wolinsky, H.; Glagov, S. A Lamellar Unit of Aortic Medial Structure and Function in Mammals. *Circ. Res.* **1967**, *20*, 99–111. [[CrossRef](#)]
9. Fhayli, W.; Boëté, Q.; Harki, O.; Briançon-Marjollet, A.; Jacob, M.-P.; Faury, G. Rise and Fall of Elastic Fibers from Development to Aging. Consequences on Arterial Structure-Function and Therapeutical Perspectives. *Matrix Biol.* **2019**, *84*, 41–56. [[CrossRef](#)]
10. Baldwin, A.K.; Simpson, A.; Steer, R.; Cain, S.A.; Kielty, C.M. Elastic Fibres in Health and Disease. *Expert Rev. Mol. Med.* **2013**, *15*, e8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Arnaud, C.; Beguin, P.; Lantuejoul, S.; Pepin, J.-L.; Guillermet, C.; Pelli, G.; Burger, F.; Buatois, V.; Ribuot, C.; Baguet, J.-P.; et al. The Inflammatory Preatherosclerotic Remodeling Induced by Intermittent Hypoxia Is Attenuated by RANTES/CCL5 Inhibition. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2011**, *184*, 724–731. [[CrossRef](#)]
12. Pezet, M.; Jacob, M.-P.; Escoubet, B.; Gheduzzi, D.; Tillet, E.; Perret, P.; Huber, P.; Quaglino, D.; Vranckx, R.; Li, D.Y.; et al. Elastin Haploinsufficiency Induces Alternative Aging Processes in the Aorta. *Rejuvenat. Res.* **2008**, *11*, 97–112. [[CrossRef](#)]
13. Mariko, B.; Pezet, M.; Escoubet, B.; Bouillot, S.; Andrieu, J.-P.; Starcher, B.; Quaglino, D.; Jacob, M.-P.; Huber, P.; Ramirez, F.; et al. Fibrillin-1 Genetic Deficiency Leads to Pathological Ageing of Arteries in Mice. *J. Pathol.* **2011**, *224*, 33–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Duque Lasio, M.L.; Kozel, B.A. Elastin-Driven Genetic Diseases. *Matrix Biol.* **2018**, *71*, 144–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Kassai, B.; Bouyé, P.; Gilbert-Dussardier, B.; Godart, F.; Thambo, J.-B.; Rossi, M.; Cochat, P.; Chirossel, P.; Luong, S.; Serusclat, A.; et al. Minoxidil versus Placebo in the Treatment of Arterial Wall Hypertrophy in Children with Williams Beuren Syndrome: A Randomized Controlled Trial. *BMC Pediatr.* **2019**, *19*, 170. [[CrossRef](#)]
16. Curran, M.E.; Atkinson, D.L.; Ewart, A.K.; Morris, C.A.; Leppert, M.F.; Keating, M.T. The Elastin Gene Is Disrupted by a Translocation Associated with Supravalvular Aortic Stenosis. *Cell* **1993**, *73*, 159–168. [[CrossRef](#)]
17. Ewart, A.K.; Morris, C.A.; Atkinson, D.; Jin, W.; Sternes, K.; Spallone, P.; Stock, A.D.; Leppert, M.; Keating, M.T. Hemizygoty at the Elastin Locus in a Developmental Disorder, Williams Syndrome. *Nat. Genet.* **1993**, *5*, 11–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Li, D.Y.; Faury, G.; Taylor, D.G.; Davis, E.C.; Boyle, W.A.; Mecham, R.P.; Stenzel, P.; Boak, B.; Keating, M.T. Novel Arterial Pathology in Mice and Humans Hemizygous for Elastin. *J. Clin. Investig.* **1998**, *102*, 1783–1787. [[CrossRef](#)]
19. Faury, G.; Pezet, M.; Knutsen, R.H.; Boyle, W.A.; Heximer, S.P.; McLean, S.E.; Minkes, R.K.; Blumer, K.J.; Kovacs, A.; Kelly, D.P.; et al. Developmental Adaptation of the Mouse Cardiovascular System to Elastin Haploinsufficiency. *J. Clin. Investig.* **2003**, *112*, 1419–1428. [[CrossRef](#)]
20. Sproul, E.P.; Argraves, W.S. A Cytokine Axis Regulates Elastin Formation and Degradation. *Matrix Biol.* **2013**, *32*, 86–94. [[CrossRef](#)]
21. Hayashi, A.; Suzuki, T.; Wachi, H.; Tajima, S.; Nishikawa, T.; Murad, S.; Pinnell, S.R. Minoxidil Stimulates Elastin Expression in Aortic Smooth Muscle Cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *315*, 137–141. [[CrossRef](#)]
22. Tokimitsu, I.; Tajima, S. Inhibition of Elastin Synthesis by High Potassium Salt Is Mediated by Ca<sup>2+</sup> Influx in Cultured Smooth Muscle Cells in Vitro: Reciprocal Effects of K<sup>+</sup> on Elastin and Collagen Synthesis. *J. Biochem.* **1994**, *115*, 536–539. [[CrossRef](#)]
23. Lannoy, M.; Slove, S.; Louedec, L.; Choqueux, C.; Journé, C.; Michel, J.-B.; Jacob, M.-P. Inhibition of ERK1/2 Phosphorylation: A New Strategy to Stimulate Elastogenesis in the Aorta. *Hypertension* **2014**, *64*, 423–430. [[CrossRef](#)]
24. Tsoporis, J.; Keeley, F.W.; Lee, R.M.; Leenen, F.H. Arterial Vasodilation and Vascular Connective Tissue Changes in Spontaneously Hypertensive Rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1998**, *31*, 960–962. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Knutsen, R.H.; Beeman, S.C.; Broekelmann, T.J.; Liu, D.; Tsang, K.M.; Kovacs, A.; Ye, L.; Danback, J.R.; Watson, A.; Wardlaw, A.; et al. Minoxidil Improves Vascular Compliance, Restores Cerebral Blood Flow, and Alters Extracellular Matrix Gene Expression in a Model of Chronic Vascular Stiffness. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2018**, *315*, H18–H32. [[CrossRef](#)]
26. Slove, S.; Lannoy, M.; Behmoaras, J.; Pezet, M.; Sloboda, N.; Lacolley, P.; Escoubet, B.; Buján, J.; Jacob, M.-P. Potassium Channel Openers Increase Aortic Elastic Fiber Formation and Reverse the Genetically Determined Elastin Deficit in the BN Rat. *Hypertension* **2013**, *62*, 794–801. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Coquand-Gandit, M.; Jacob, M.-P.; Fhayli, W.; Romero, B.; Georgieva, M.; Bouillot, S.; Estève, E.; Andrieu, J.-P.; Brasseur, S.; Bouyon, S.; et al. Chronic Treatment with Minoxidil Induces Elastic Fiber Neosynthesis and Functional Improvement in the Aorta of Aged Mice. *Rejuvenat. Res.* **2017**, *20*, 218–230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Fhayli, W.; Boyer, M.; Ghandour, Z.; Jacob, M.P.; Andrieu, J.P.; Starcher, B.C.; Estève, E.; Faury, G. Chronic Administration of Minoxidil Protects Elastic Fibers and Stimulates Their Neosynthesis with Improvement of the Aorta Mechanics in Mice. *Cell Signal* **2019**, *62*, 109333. [[CrossRef](#)]
29. Raveaud, S.; Mezin, P.; Lavanchy, N.; Starcher, B.; Mecham, R.P.; Verdeti, J.; Faury, G. Effects of Chronic Treatment with a Low Dose of Nicorandil on the Function of the Rat Aorta during Ageing. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2009**, *36*, 988–994. [[CrossRef](#)]

30. Bouhedja, M.; Peres, B.; Fhayli, W.; Ghandour, Z.; Boumendjel, A.; Faury, G.; Khelili, S. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Ring-Opened Cromakalim Analogues with Relaxant Effects on Vascular and Respiratory Smooth Muscles and as Stimulators of Elastin Synthesis. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *144*, 774–796. [[CrossRef](#)]
31. Bouider, N.; Fhayli, W.; Ghandour, Z.; Boyer, M.; Harrouche, K.; Florence, X.; Pirotte, B.; Lebrun, P.; Faury, G.; Khelili, S. Design and Synthesis of New Potassium Channel Activators Derived from the Ring Opening of Diazoxide: Study of Their Vasodilatory Effect, Stimulation of Elastin Synthesis and Inhibitory Effect on Insulin Release. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 1735–1746. [[CrossRef](#)]
32. Fhayli, W.; Boëté, Q.; Kihal, N.; Cenizo, V.; Sommer, P.; Boyle, W.A.; Jacob, M.-P.; Faury, G. Dill Extract Induces Elastic Fiber Neosynthesis and Functional Improvement in the Ascending Aorta of Aged Mice with Reversal of Age-Dependent Cardiac Hypertrophy and Involvement of Lysyl Oxidase-Like-1. *Biomolecules* **2020**, *10*, 173. [[CrossRef](#)]
33. Nonaka, R.; Sato, F.; Wachi, H. Domain 36 of Tropoelastin in Elastic Fiber Formation. *Biol. Pharm. Bull.* **2014**, *37*, 698–702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Bax, D.V.; Rodgers, U.R.; Bilek, M.M.M.; Weiss, A.S. Cell Adhesion to Tropoelastin Is Mediated via the C-Terminal GRKRK Motif and Integrin AlphaVbeta3. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 28616–28623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Faury, G. Role of the Elastin-Laminin Receptor in the Cardiovascular System. *Pathol. Biol.* **1998**, *46*, 517–526. [[PubMed](#)]
36. Rodgers, U.R.; Weiss, A.S. Integrin Alpha v Beta 3 Binds a Unique Non-RGD Site near the C-Terminus of Human Tropoelastin. *Biochimie* **2004**, *86*, 173–178. [[CrossRef](#)]
37. Wahart, A.; Hocine, T.; Albrecht, C.; Henry, A.; Sarazin, T.; Martiny, L.; El Btaouri, H.; Maurice, P.; Bennasroune, A.; Romier-Crouzet, B.; et al. Role of Elastin Peptides and Elastin Receptor Complex in Metabolic and Cardiovascular Diseases. *FEBS J.* **2019**, *286*, 2980–2993. [[CrossRef](#)]
38. Yamashiro, Y.; Yanagisawa, H. The Molecular Mechanism of Mechanotransduction in Vascular Homeostasis and Disease. *Clin. Sci.* **2020**, *134*, 2399–2418. [[CrossRef](#)]
39. Chen, J.; Yu, J.; Yuan, R.; Li, N.; Li, C.; Zhang, X. MTOR Inhibitor Improves Testosterone-Induced Myocardial Hypertrophy in Hypertensive Rats. *J. Endocrinol.* **2021**, *252*, 179–193. [[CrossRef](#)]
40. Robinet, A.; Millart, H.; Oszust, F.; Hornebeck, W.; Bellon, G. Binding of Elastin Peptides to S-Gal Protects the Heart against Ischemia/Reperfusion Injury by Triggering the RISK Pathway. *FASEB J.* **2007**, *21*, 1968–1978. [[CrossRef](#)]
41. Azevedo, J.; Arroja, I.; Jacques, A.; Santos, I.; Amado, P.; Marques, J.C.; Araújo, V. A double ambulatory product (blood pressure and heart rate), mild arterial hypertension and left ventricular hypertrophy. *Rev. Port. Cardiol.* **1993**, *12*, 663–673, 602.
42. Sahu, S.P.; Liu, Q.; Prasad, A.; Hasan, S.M.A.; Liu, Q.; Rodriguez, M.X.B.; Mukhopadhyay, O.; Burk, D.; Francis, J.; Mukhopadhyay, S.; et al. Characterization of Fibrillar Collagen Isoforms in Infarcted Mouse Hearts Using Second Harmonic Generation Imaging. *Biomed. Opt. Express* **2020**, *12*, 604–618. [[CrossRef](#)]
43. McNulty, M.; Mahmud, A.; Spiers, P.; Feely, J. Collagen Type-I Degradation Is Related to Arterial Stiffness in Hypertensive and Normotensive Subjects. *J. Hum. Hypertens.* **2006**, *20*, 867–873. [[CrossRef](#)]
44. Li, D.Y.; Brooke, B.; Davis, E.C.; Mecham, R.P.; Sorensen, L.K.; Boak, B.B.; Eichwald, E.; Keating, M.T. Elastin Is an Essential Determinant of Arterial Morphogenesis. *Nature* **1998**, *393*, 276–280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Urbán, Z.; Riazzi, S.; Seidl, T.L.; Katahira, J.; Smoot, L.B.; Chitayat, D.; Boyd, C.D.; Hinek, A. Connection between Elastin Haploinsufficiency and Increased Cell Proliferation in Patients with Supravalvular Aortic Stenosis and Williams-Beuren Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **2002**, *71*, 30–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Karnik, S.K.; Brooke, B.S.; Bayes-Genis, A.; Sorensen, L.; Wythe, J.D.; Schwartz, R.S.; Keating, M.T.; Li, D.Y. A Critical Role for Elastin Signaling in Vascular Morphogenesis and Disease. *Development* **2003**, *130*, 411–423. [[CrossRef](#)]
47. Li, W.; Li, Q.; Qin, L.; Ali, R.; Qyang, Y.; Tassabehji, M.; Pober, B.R.; Sessa, W.C.; Giordano, F.J.; Tellides, G. Rapamycin Inhibits Smooth Muscle Cell Proliferation and Obstructive Arteriopathy Attributable to Elastin Deficiency. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2013**, *33*, 1028–1035. [[CrossRef](#)]
48. Wachi, H.; Seyama, Y.; Yamashita, S.; Suganami, H.; Uemura, Y.; Okamoto, K.; Yamada, H.; Tajima, S. Stimulation of Cell Proliferation and Autoregulation of Elastin Expression by Elastin Peptide VPGVG in Cultured Chick Vascular Smooth Muscle Cells. *FEBS Lett.* **1995**, *368*, 215–219. [[CrossRef](#)]
49. Debret, R.; Faye, C.; Sohier, J.; Sommer, P. Polypeptide Derive de la Tropoelastine et Materiau Biocompatible le Comprenant. WIPO Patent WO2017/194761 A, 16 November 2017.
50. Le Page, A.; Khalil, A.; Vermette, P.; Frost, E.H.; Larbi, A.; Witkowski, J.M.; Fulop, T. The Role of Elastin-Derived Peptides in Human Physiology and Diseases. *Matrix Biol.* **2019**, *84*, 81–96. [[CrossRef](#)]
51. Karnik, S.K.; Wythe, J.D.; Sorensen, L.; Brooke, B.S.; Urness, L.D.; Li, D.Y. Elastin Induces Myofibrillogenesis via a Specific Domain, VGVAPG. *Matrix Biol.* **2003**, *22*, 409–425. [[CrossRef](#)]
52. Owens, E.A.; Jie, L.; Reyes, B.A.S.; Van Bockstaele, E.J.; Osei-Owusu, P. Elastin Insufficiency Causes Hypertension, Structural Defects and Abnormal Remodeling of Renal Vascular Signaling. *Kidney Int.* **2017**, *92*, 1100–1118. [[CrossRef](#)]
53. Faury, G.; Ristori, M.T.; Verdetti, J.; Jacob, M.P.; Robert, L. Role of the elastin-laminin receptor in the vasoregulation. *C. R. Acad. Sci. III* **1994**, *317*, 807–811. [[PubMed](#)]
54. Faury, G.; Ristori, M.T.; Verdetti, J.; Jacob, M.P.; Robert, L. Effect of Elastin Peptides on Vascular Tone. *J. Vasc. Res.* **1995**, *32*, 112–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Faury, G.; Chabaud, A.; Ristori, M.T.; Robert, L.; Verdetti, J. Effect of Age on the Vasodilatory Action of Elastin Peptides. *Mech. Ageing Dev.* **1997**, *95*, 31–42. [[CrossRef](#)]

56. Faury, G.; Garnier, S.; Weiss, A.S.; Wallach, J.; Fülöp, T.; Jacob, M.P.; Mecham, R.P.; Robert, L.; Verdeti, J. Action of Tropoelastin and Synthetic Elastin Sequences on Vascular Tone and on Free Ca<sup>2+</sup> Level in Human Vascular Endothelial Cells. *Circ. Res.* **1998**, *82*, 328–336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Meyer, D.E.; Chilkoti, A. Purification of Recombinant Proteins by Fusion with Thermally-Responsive Polypeptides. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 1112–1115. [[CrossRef](#)]
58. Faury, G.; Maher, G.M.; Li, D.Y.; Keating, M.T.; Mecham, R.P.; Boyle, W.A. Relation between Outer and Luminal Diameter in Cannulated Arteries. *Am. J. Physiol.* **1999**, *277*, H1745–H1753. [[CrossRef](#)]
59. Gibbons, C.A.; Shadwick, R.E. Functional Similarities in the Mechanical Design of the Aorta in Lower Vertebrates and Mammals. *Experientia* **1989**, *45*, 1083–1088. [[CrossRef](#)]
60. Liu, K.L.; Canaple, L.; Del Carmine, P.; Gauthier, K.; Beylot, M.; Lo, M. Thyroid Hormone Receptor- $\alpha$  Deletion Decreases Heart Function and Exercise Performance in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Physiol. Genom.* **2016**, *48*, 73–81. [[CrossRef](#)]
61. Shikata, T.; Uzawa, T.; Yoshiwara, N.; Akatsuka, T.; Yamazaki, S. Staining Methods of Australia Antigen in Paraffin Section—Detection of Cytoplasmic Inclusion Bodies. *Jpn. J. Exp. Med.* **1974**, *44*, 25–36.
62. Henwood, T. Shikata's Orcein Stain—A Routine Stain for Liver Biopsies. *Aust. J. Med. Lab. Sci.* **1983**, *4*, 76–80.
63. Bauman, T.M.; Nicholson, T.M.; Abler, L.L.; Eliceiri, K.W.; Huang, W.; Vezina, C.M.; Ricke, W.A. Characterization of Fibrillar Collagens and Extracellular Matrix of Glandular Benign Prostatic Hyperplasia Nodules. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e109102. [[CrossRef](#)]
64. Bredfeldt, J.S.; Liu, Y.; Pehlke, C.A.; Conklin, M.W.; Szulczewski, J.M.; Inman, D.R.; Keely, P.J.; Nowak, R.D.; Mackie, T.R.; Eliceiri, K.W. Computational Segmentation of Collagen Fibers from Second-Harmonic Generation Images of Breast Cancer. *J. Biomed. Opt.* **2014**, *19*, 016007. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Liu, Y.; Keikhosravi, A.; Mehta, G.S.; Drifka, C.R.; Eliceiri, K.W. Methods for Quantifying Fibrillar Collagen Alignment. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1627*, 429–451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Liu, Y.; Keikhosravi, A.; Pehlke, C.A.; Bredfeldt, J.S.; Dutson, M.; Liu, H.; Mehta, G.S.; Claus, R.; Patel, A.J.; Conklin, M.W.; et al. Fibrillar Collagen Quantification With Curvelet Transform Based Computational Methods. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. CT-FIRE. Available online: <https://eliceirilab.org/software/ctfire/> (accessed on 17 March 2022).
68. Smith, J.J.; Kampine, J.P. *Circulatory Physiology: The Essentials*, 3rd ed.; Williams & Wilkins: Baltimore, MD, USA, 1990; ISBN 978-0-683-07775-9.

## Supplementary data

**Supplementary data S1.** Effects of sex and genotype on the measured parameters, independently of SEP treatment

### 1. Body and heart weights, hematocrit

Hematocrit was similar in the 8 groups. Body weight and left ventricle weight were generally found lower in female than male mice, independently of SEP treatment or genotype. Also, confirming our previous results [12,19], a general significant total heart and left ventricle hypertrophy was generally observed in *Eln*<sup>+/-</sup> mice, compared to their *Eln*<sup>+/+</sup> counterparts, independently of sex and SEP treatment (Supplementary data S1.1).

**Supplementary data S1.1.** Body weight, hematocrit and ratios of total heart and left ventricle plus septum weights to body weight.

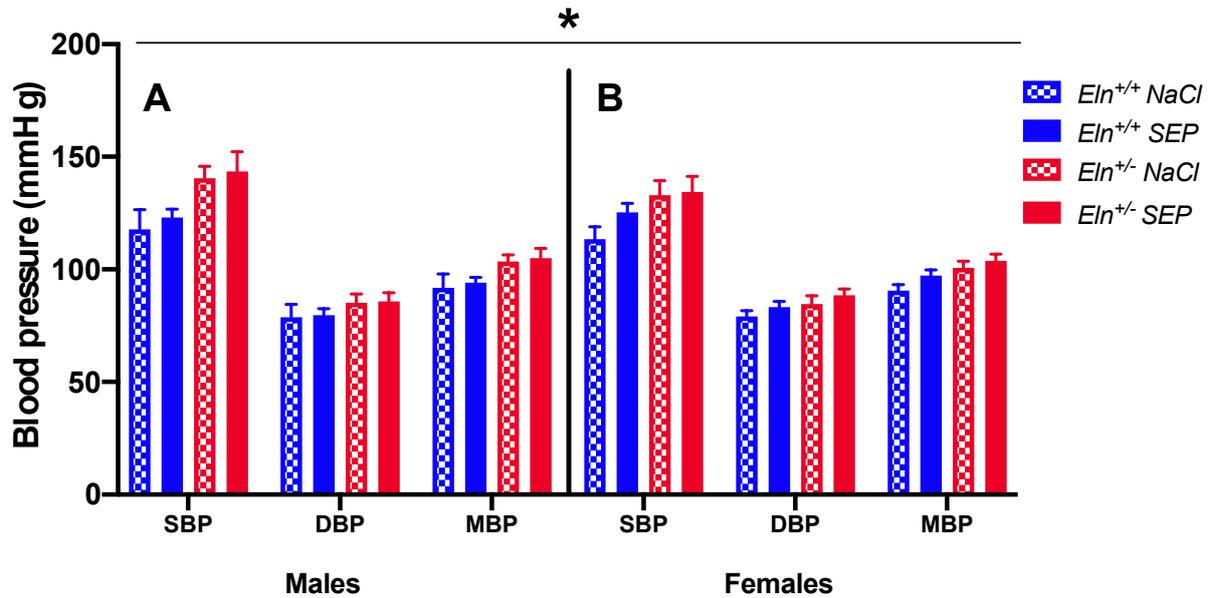
	Male				Female			
	<i>Eln</i> <sup>+/+</sup>		<i>Eln</i> <sup>+/-</sup>		<i>Eln</i> <sup>+/+</sup>		<i>Eln</i> <sup>+/-</sup>	
	NaCl	SEP	NaCl	SEP	NaCl	SEP	NaCl	SEP
<b>BW (g)</b> <sup>£</sup>	34.3 ± 1.2	34.7 ± 1.1	36.2 ± 1.6	34.1 ± 1.0	26.6 ± 0.8	25.7 ± 0.7	27.5 ± 1.2	27.3 ± 1.5
<b>Hematocrit (%)</b>	37.8 ± 1.4	38.7 ± 0.8	39.4 ± 1.3	40.7 ± 1.4	39.9 ± 1.0	37.9 ± 1.8	40.0 ± 1.8	35.7 ± 1.3
<b>HW/BW (%)</b> <sup>*</sup>	0.46 ± 0.01	0.48 ± 0.01	0.48 ± 0.02	0.52 ± 0.01	0.47 ± 0.02	0.45 ± 0.01	0.49 ± 0.02	0.47 ± 0.02
<b>LV+S/BW (%)</b> <sup>* £</sup>	0.35 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.36 ± 0.02	0.41 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.35 ± 0.01

BW: body weight, HW: heart weight, LV: left ventricle weight, S: septum weight. <sup>£</sup> general significant difference between male and female mice, independently of SEP treatment and genotype (three-way ANOVA, p≤0.05).

<sup>\*</sup>general significant difference between *Eln*<sup>+/+</sup> and *Eln*<sup>+/-</sup> mice, independently of SEP treatment and sex (three-way ANOVA, p≤0.05). Control animals were injected with the same volume of 0.9% NaCl. Values are mean ± SEM. n = 7-10 per group.

### 2.2. Blood pressure

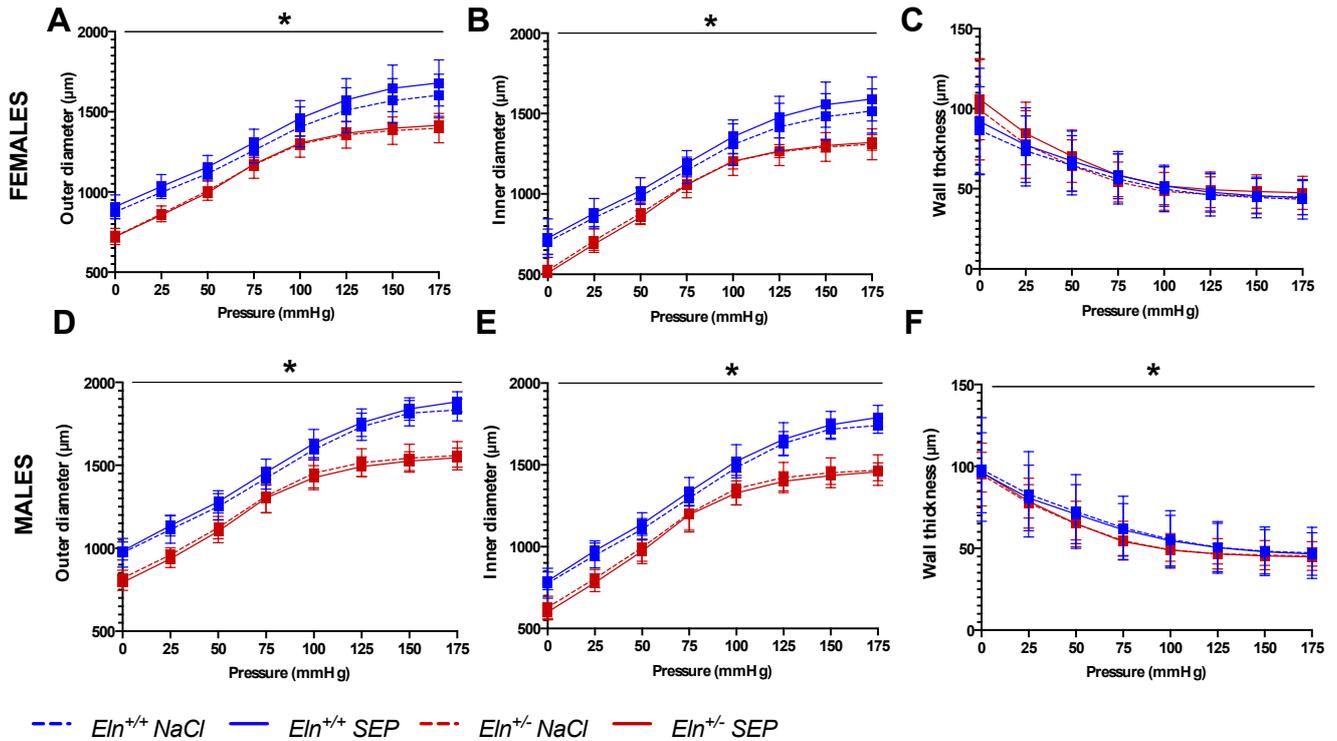
As expected [12,19], blood pressures, measured by carotid artery catheterization, were substantially increased in adult *Eln*<sup>+/-</sup> (SBP = 133 ± 6 mmHg and 140 ± 5 mmHg in females and males, respectively) compared to *Eln*<sup>+/+</sup> animals (SBP = 113 ± 6 mmHg and 118 ± 9 mmHg in females and males, respectively), independently of treatment and sex (four-way ANOVA, p≤0.05) (Supplementary data S1.2).



**Supplementary data S1.2.** Systolic, mean and diastolic arterial blood pressures. The measurements were performed 3 days after NaCl (control) or SEP intravenous injection in the caudal vein of male and female mice of *Eln*<sup>+/+</sup> or *Eln*<sup>+/-</sup> genotypes. (A) Males, (B) Females, SBP: Systolic Blood Pressure, DBP: Diastolic Blood Pressure, MBP: Mean Blood Pressure. \*general significant difference between *Eln*<sup>+/+</sup> or *Eln*<sup>+/-</sup> mice, independently of sex and SEP treatment (four-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ). Control animals were injected with the same volume of 0.9% NaCl. Values are mean  $\pm$  SEM.  $n = 4-7$  per group.

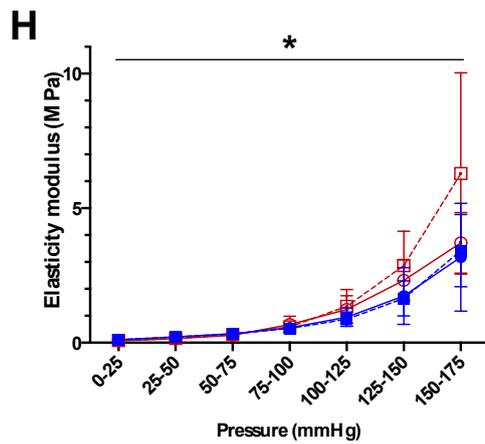
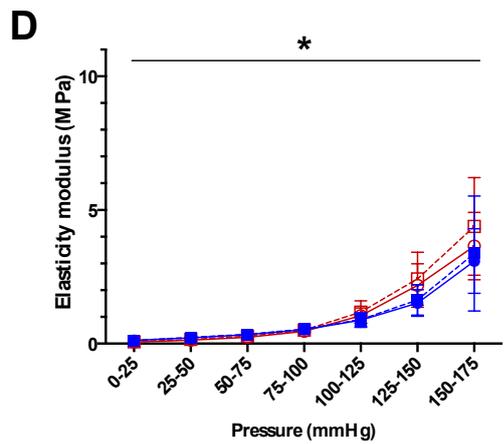
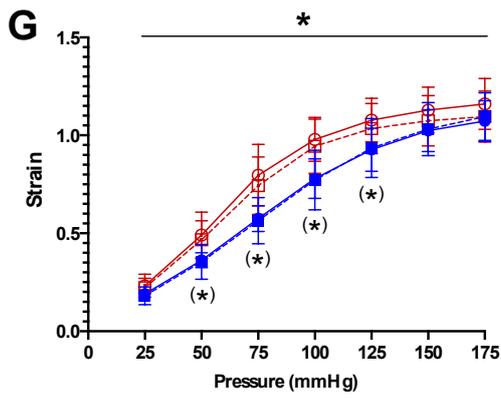
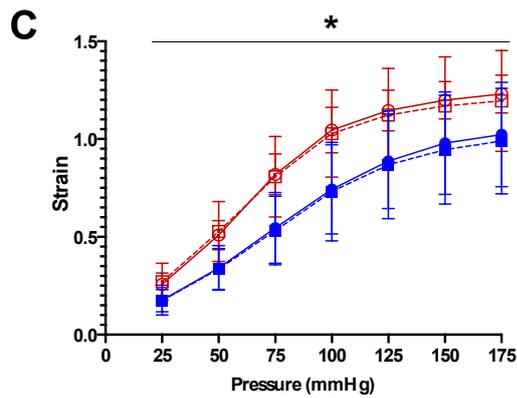
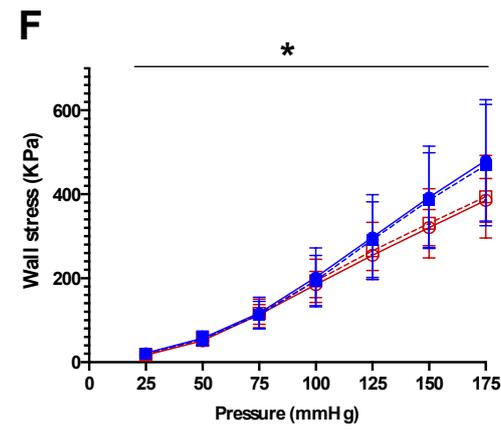
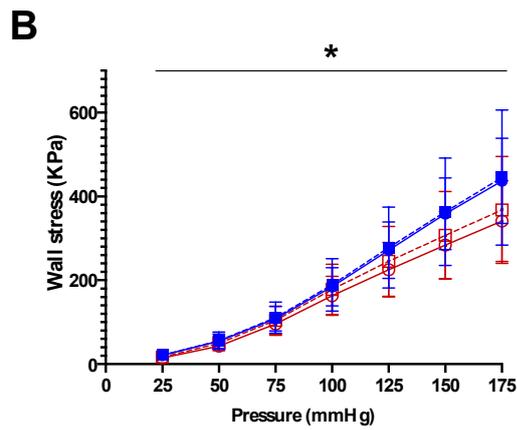
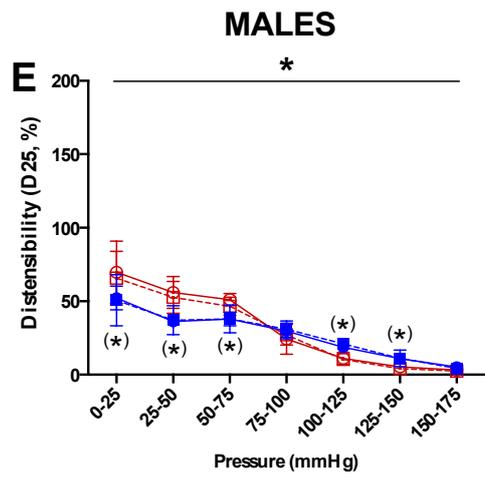
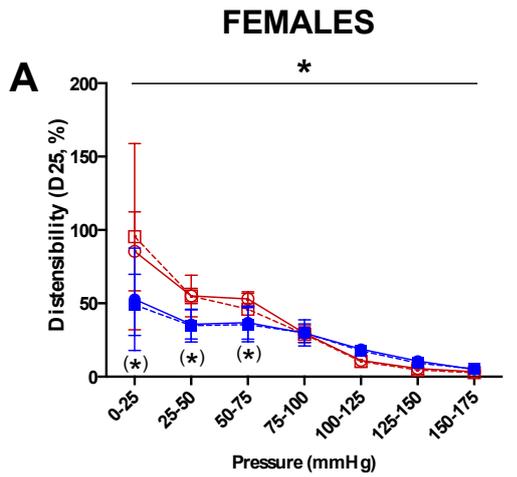
### 2.3. Biomechanics of the cannulated ascending aorta

Ex-vivo biomechanical studies of the cannulated ascending aorta showed that outer (OD) and inner diameters (ID) were generally larger in males than females, independently of genotype and SEP treatment (four-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ). Also, independently of pressure, it was observed a general decrease in: i) arterial ID and OD in *Eln*<sup>+/-</sup> mice of both sexes, and ii) wall thickness in male *Eln*<sup>+/-</sup> mice only, compared to corresponding *Eln*<sup>+/+</sup> animals (Supplementary data S1.3).



**Supplementary data S1.3.** Diameter-pressure and wall-thickness-pressure curves of the cannulated ascending aorta. The measurements were performed by pressure arteriography, 3 days after NaCl (control) or SEP intravenous injection in the caudal vein of male and female mice of *Eln*<sup>+/+</sup> or *Eln*<sup>+/-</sup> genotypes (A, B, C: females ; D, E, F: males). (A,D): outer diameter-pressure relation. (B,E): inner diameter-pressure relation. (C,F): wall thickness-pressure relation. \*general significant difference between *Eln*<sup>+/+</sup> or *Eln*<sup>+/-</sup> mice of each sex, independently of SEP treatment (three-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ). Control animals were injected with the same volume of 0.9% NaCl. Values are mean  $\pm$  SEM.  $n = 7-10$  per group.

Genotype affected all the studied mechanical parameters, i.e. distensibility, wall stress, wall strain and incremental elastic modulus, in animals of both sexes and independently of intraluminal pressure (Supplementary data S1.4). In *Eln*<sup>+/-</sup> animals, distensibility (D25) was increased at low intraluminal pressure and decreased at the highest pressures compared to that of *Eln*<sup>+/+</sup> mice (Supplementary data S1.4A,E). Circumferential wall stress, inversely proportional to wall thickness, was generally found lower (Supplementary data S1.4B,F) and circumferential wall strain was found higher in *Eln*<sup>+/-</sup> animals of both sexes, compared to wild type mice (Supplementary data S1.4C,G). Incremental elastic modulus (Einc), indicative of the wall material stiffness, was generally and significantly increased in *Eln*<sup>+/-</sup> mice of both sexes as expected, and was particularly marked in the 125-175 mmHg range (Supplementary data S1.4D,H). No general effect of sex could be detected regarding these parameters (D25, wall stress, wall strain and Einc) (Supplementary data S1.4).



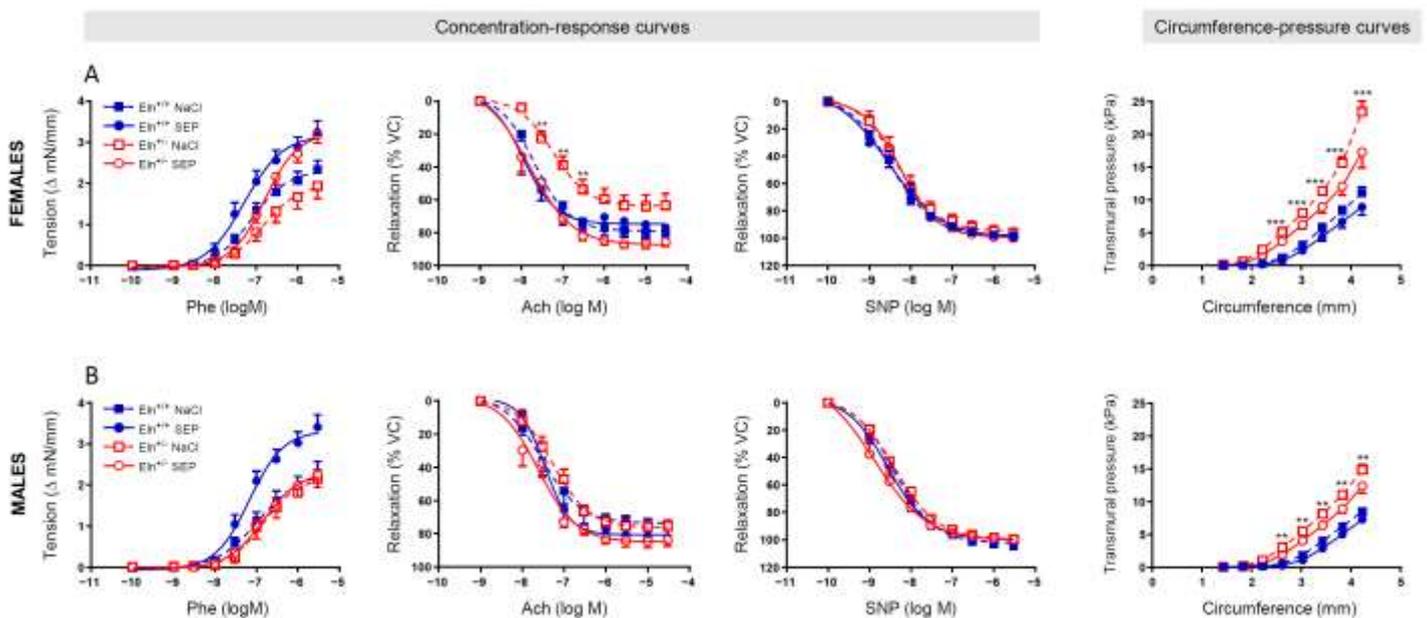
--- *Eln*<sup>+/+</sup> NaCl    — *Eln*<sup>+/+</sup> SEP    --- *Eln*<sup>+/-</sup> NaCl    — *Eln*<sup>+/-</sup> SEP

**Supplementary data S1.4.** Mechanical parameters of the cannulated ascending aorta. The measurements were performed by pressure arteriography 3 days after NaCl (control) or SEP intravenous injection in the caudal vein of male and female mice of *Eln*<sup>+/+</sup> or *Eln*<sup>+/-</sup> genotypes. (A,E) aortic distensibility per 25 mmHg increment (D25)-pressure relation; (B,F) circumferential stress-pressure relation; (C,G) circumferential strain-pressure relation; (D,H) incremental elastic modulus (Einc)-pressure increment relation. \*general significant difference between *Eln*<sup>+/+</sup> and *Eln*<sup>+/-</sup> mice, independently of SEP treatment (three-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ). (\*) significant difference at a specific pressure between *Eln*<sup>+/+</sup> and *Eln*<sup>+/-</sup> mice, independently of SEP treatment (three-way ANOVA showing a significant interaction between genotype and pressure, followed by post hoc Fishers's Least Significant Difference (LSD) test for paired comparisons,  $p \leq 0.05$ ). Control animals were injected with the same volume of 0.9% NaCl. Values are mean  $\pm$  SEM. n = 7–10 per group.

#### 2.4. Ascending aorta ring reactivity and mechanics

Tension arteriography showed that the vasoconstriction of ascending aorta rings induced by acute application of phenylephrine (Phe) did not differ between *Eln*<sup>+/-</sup> and *Eln*<sup>+/+</sup> mice of both sexes, while acetylcholine (Ach)-induced relaxation was of significantly lower amplitude than that of the other three groups in female *Eln*<sup>+/-</sup> mice only. This confirms our previous results obtained in 6-month-old *Eln*<sup>+/-</sup> and *Eln*<sup>+/+</sup> male mice [12,19]. No inter-group difference was observed for acute sodium nitroprusside (SNP)-induced relaxation (Supplementary data S1.5, three left panels for each sex).

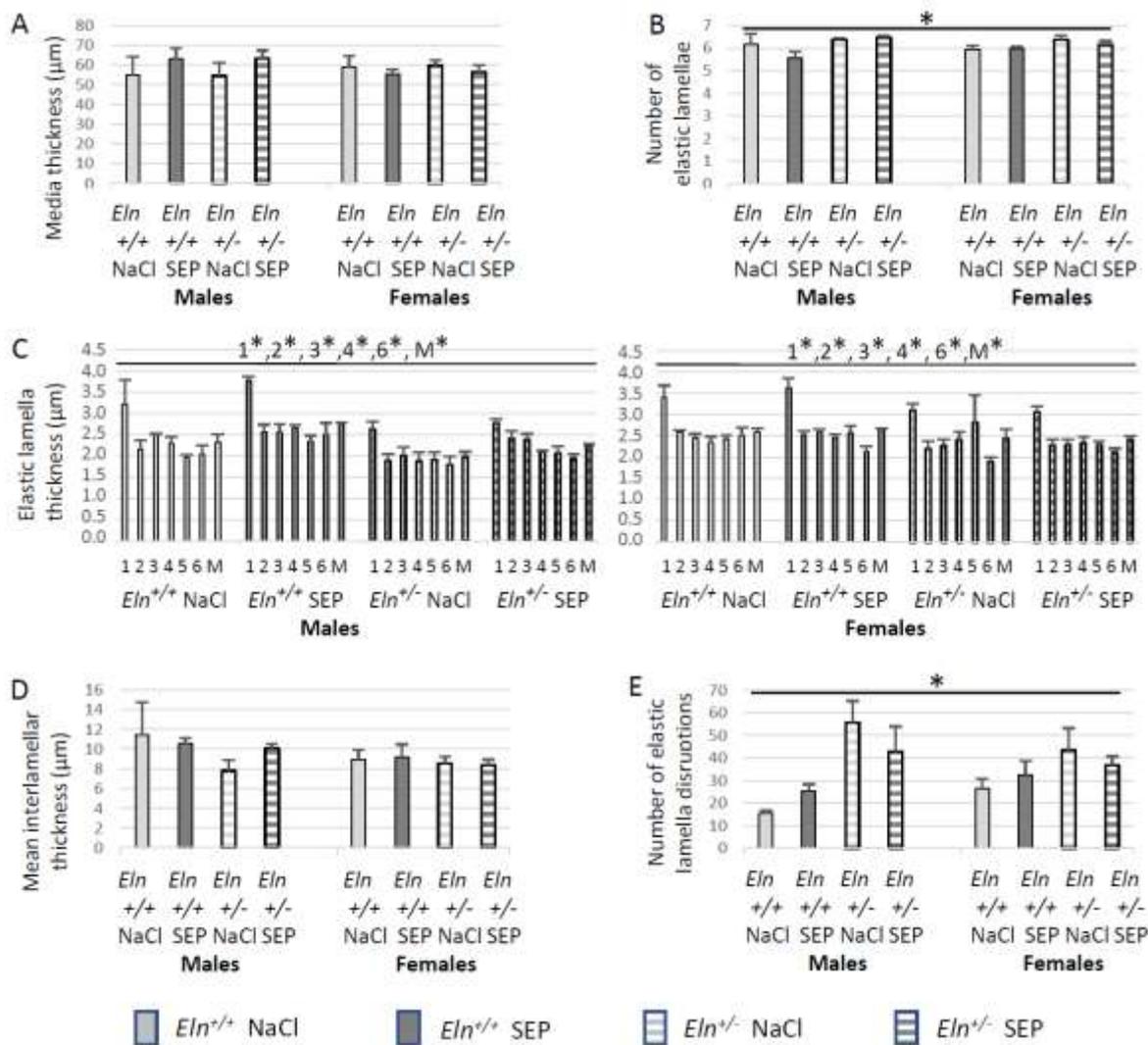
The ascending aorta circumference-transmural pressure relation, indicative of arterial stiffness, was then studied. The internal circumference determined at an effective tension of 90 mmHg was significantly lower ( $p < 0.001$ ) in *Eln*<sup>+/-</sup> ( $3.13 \pm 0.08$  and  $3.53 \pm 0.08$  mm for female and male mice, respectively) than *Eln*<sup>+/+</sup> mice ( $4.04 \pm 0.16$  and  $4.22 \pm 0.12$  mm for female and male mice, respectively). In response to increasing stretches from the internal circumference of 2.6 mm, *Eln*<sup>+/-</sup> mice had greater transmural pressure than *Eln*<sup>+/+</sup> mice for both sexes, indicative of stiffer aortae in *Eln*<sup>+/-</sup> animals (Supplementary data S1.5, right panels).



**Supplementary data S1.5.** Concentration-response and circumference-pressure curves of the ascending aorta. The studies were performed by wire myography in aortae from female (A) and male (B) *Eln<sup>+/+</sup>* and *Eln<sup>+/-</sup>* mice treated with single 0.9% NaCl (NaCl, controls) or synthetic elastic protein (SEP) intravenous injection three days before the experiments. \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  *Eln<sup>+/-</sup>*NaCl vs *Eln<sup>+/+</sup>*NaCl (two-way ANOVAs followed, when necessary, by multiple Bonferroni post-tests). Values are mean  $\pm$  SEM.  $n=11-14$  in each C group;  $n=7-8$  in each SEP group.

### 2.5. Aorta morphology and structure

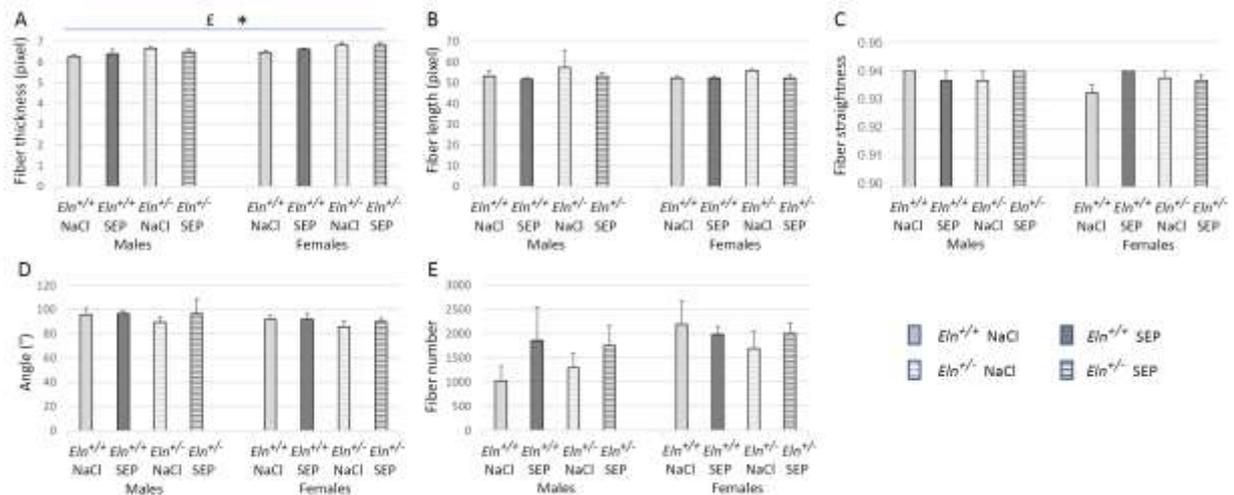
First, the ascending aorta was significantly longer in *Eln<sup>+/-</sup>* ( $2.57 \pm 0.06$  and  $2.65 \pm 0.08$  mm in females and males, respectively) than in *Eln<sup>+/+</sup>* mice ( $2.10 \pm 0.07$  and  $2.01 \pm 0.08$  mm in females and males, respectively) (unpaired t-test,  $P \leq 0.05$ ). This confirms our previous results obtained in male mice [12] and extends this finding to female animals. Histological analysis of orcein-stained aortae (see Figure 5 of the main article for representative images) indicated that no significant difference between groups could be observed regarding the media and interlamellar thicknesses (Supplementary data S1.6A,D). However, elastic lamellae were more numerous although thinner (except for lamella #5) in *Eln<sup>+/-</sup>* mice compared to their *Eln<sup>+/+</sup>* counterparts, independently of sex and treatment (Supplementary data S1.6B,C), in accordance with the literature [18]. The number of elastic lamella disruptions was generally higher in *Eln<sup>+/-</sup>* than in *Eln<sup>+/+</sup>* animals, in accordance with our previous results [12] (Supplementary data S1.6E). No sex-related difference could be detected.



**Supplementary data S1.6.** Morphology and structure of the distal part of the aortic arch analyzed by orcein staining depending on genotype, sex and SEP treatment. The measurements were performed three days after NaCl (control) or SEP intravenous injection in the caudal vein of male and female mice of *Eln*<sup>+/+</sup> or *Eln*<sup>+/-</sup> genotypes. (A) Media thickness. (B) Number of elastic lamellae. (C) Mean thickness of the elastic lamellae (M) and thickness of each elastic lamellae, numbered from the luminal side of the media to the external side of the media, lamella #1 being the internal elastic lamina (see Figure 5 of the main article for illustration). (D) Mean of interlamellar thickness. (E) Number of elastic lamella disruptions. \*general significant difference between *Eln*<sup>+/+</sup> and *Eln*<sup>+/-</sup> mice, independently of SEP treatment (three-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ). In panel C, the symbol \* next to the lamella number or mean thickness (M) indicates a significant difference between genotypes for the corresponding lamella or the mean only. Control animals were injected with the same volume of 0.9% NaCl (NaCl). Values are mean  $\pm$  SEM.  $n=3-6$  in each group.

Morphometric and quantitative analyses (CT-FIRE) of picrosirius red-stained collagen fibers in aorta cross-sections were then performed. Representative images are presented in Figure 7 of the main article. The thickness of the collagen fibers present in the entire wall was generally higher in females than males, and in *Eln*<sup>+/-</sup> than *Eln*<sup>+/+</sup> mice, independently of SEP treatment (Supplementary data S1.7A). When the analysis was restricted to the media, the collagen fibers were also found thicker in female than male animals, whereas no effect of genotype could be detected (Supplementary data S3A). While no effect of sex and genotype could be observed on the collagen fiber length in cross sections of the entire wall (Supplementary data S1.7B), collagen fibers were

generally found longer in females than males, and in *Eln*<sup>+/-</sup> than *Eln*<sup>+/-</sup> animals, when the analysis was restricted to the media (Supplementary data S3B). Collagen fiber straightness and angle were not changed by sex or genotype in the entire wall sections and when the analysis was restricted to the media (Supplementary data S1.7C,D and Supplementary data S3C,D). Finally, the collagen fiber number per aorta section was generally found lower in *Eln*<sup>+/-</sup> than *Eln*<sup>+/-</sup> mice, when the analysis was restricted to the media, not in the entire wall (Supplementary data S1.7E and Supplementary data S3E).



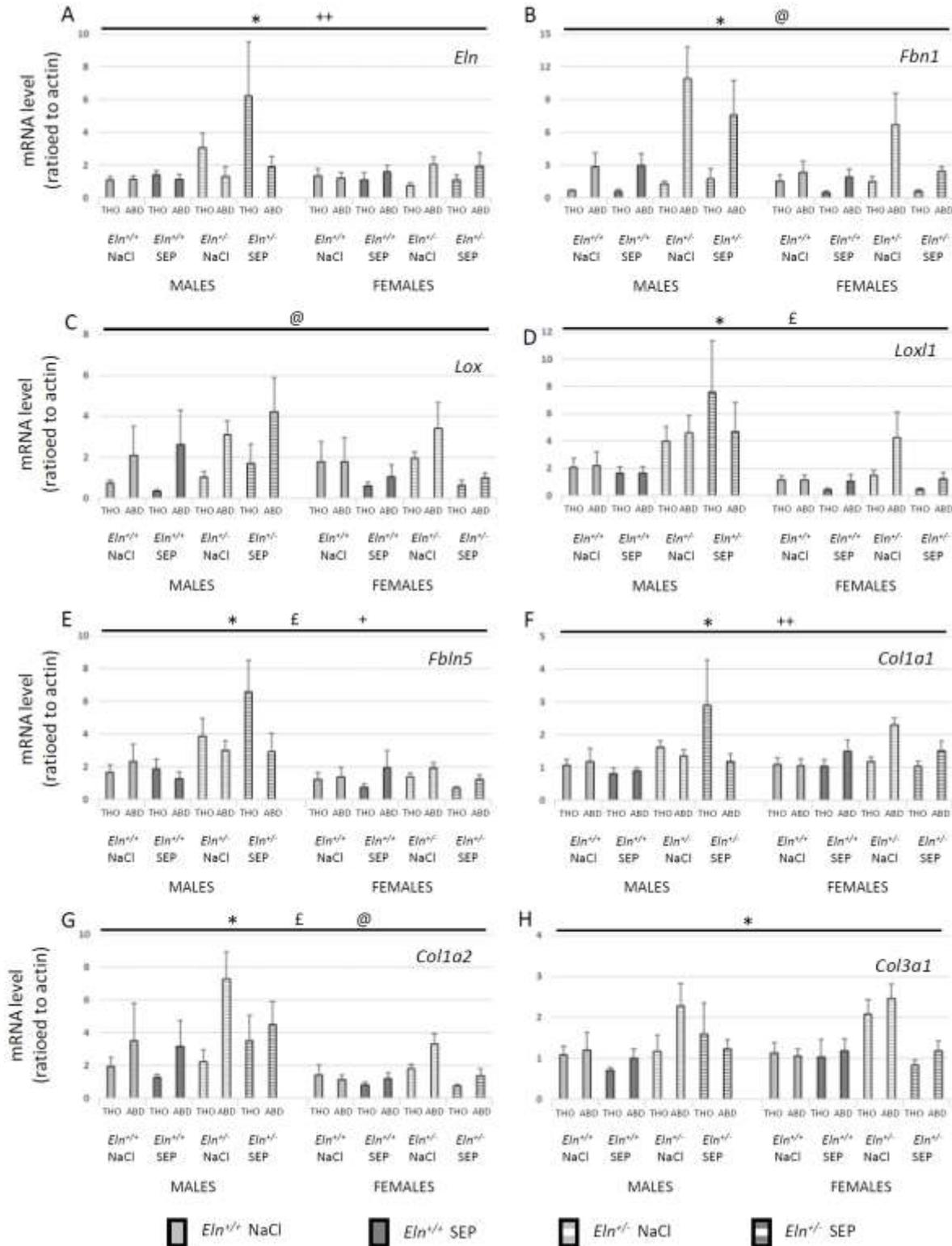
**Supplementary data S1.7.** CT-FIRE analysis of picosirius red-stained cross-sections of the distal part of the aortic arch (entire aorta wall) illuminated with polarized light. The measurements were performed 3 days after NaCl (control) or SEP intravenous injection in the caudal vein of male and female mice of *Eln*<sup>+/-</sup> or *Eln*<sup>+/-</sup> genotypes. Individual properties and quantity of collagen fibers were compared between the studied groups: (A) fiber thickness, (B) length, (C) straightness, (D) angle and (E) number of fibers per aorta. \*general significant difference between *Eln*<sup>+/-</sup> and *Eln*<sup>+/-</sup> mice, independently of treatment and sex (three-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ). <sup>£</sup>general significant difference between male and female mice, independently of treatment and genotype (three-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ). Control animals were injected with the same volume of 0.9% NaCl (NaCl). Values are mean  $\pm$  SEM.  $n=3-6$  in each group.

## 2.6. Aortic tissue mRNA levels

In order to have a wider view of the SEP impact on gene expressions in large elastic arteries and save animals, the gene transcripts were measured in thoracic and abdominal aorta segments by RT-qPCR. The mRNA levels were generally higher in *Eln*<sup>+/-</sup> than *Eln*<sup>+/-</sup> regarding all the genes, with the exception of *Lox*, independently of sex, treatment and vessel segment, and in males than females regarding *Loxl1*, *Fbln5* and *Col1a2* animals (Supplementary data S1.8). The mRNA levels were particularly elevated in male *Eln*<sup>+/-</sup> mice compared to their *Eln*<sup>+/-</sup> counterparts for *Fbln5* and *Loxl1*, independently of the vessel segment (Supplementary data S1.8E), and in the thoracic aorta only for *Eln* and *Col1a1* (Supplementary data S1.8A,F).

The mRNA levels were also generally found significantly higher in the abdominal aorta segment than in its thoracic counterpart for *Fbn1*, *Lox* and *Col1a2*, independently of animal sex, genotype and treatment

(Supplementary data S1.8B,C,G). Conversely, for *Col1a1*, mRNA levels were higher in the thoracic than in the abdominal aortic segment in *Eln*<sup>+/-</sup> male mice, while they were similar in abdominal or thoracic segments in *Eln*<sup>+/-</sup> mice of both sexes (Supplementary data S1.8F).

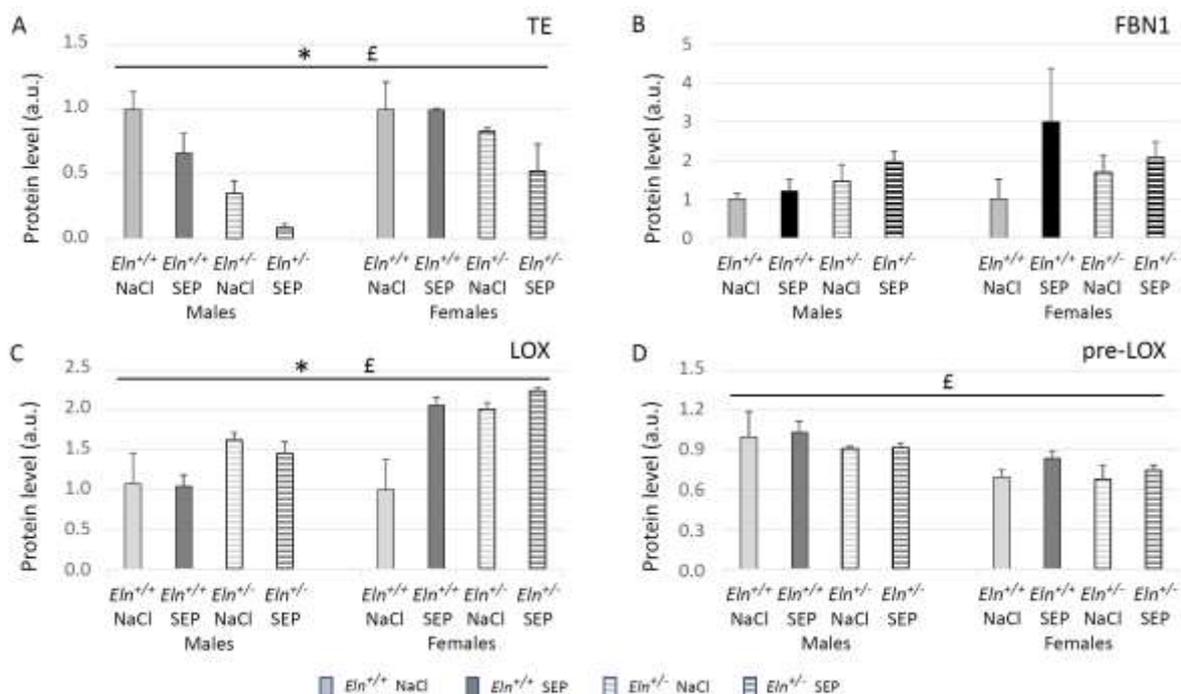


**Supplementary data S1.8.** Effect of SEP treatment on the levels of mRNAs expressed from the genes of the major components of aortic elastic and collagen fibers. The measurements were performed by RT-qPCR in descending

thoracic (THO) and abdominal (ABD) aorta segments, 3 days after SEP or NaCl (control) intravenous injection in the caudal vein of male and female mice of *Eln*<sup>+/+</sup> or *Eln*<sup>+/-</sup> genotype. (A) tropoelastin (*Eln*), (B) fibrillin-1 (*Fbn1*), (C) lysyl oxidase (*Lox*), (D) lysyl oxidase-like-1 (*Loxl1*), (E) fibulin-5 (*Fbln5*), (F) type I collagen alpha-1 (*Col1a1*), (G) type I collagen alpha-2 (*Col1a2*), (H) type III collagen alpha-1 (*Col3a1*). \*general significant difference between *Eln*<sup>+/+</sup> and *Eln*<sup>+/-</sup> mice, independently of sex, SEP treatment and vessel segment (four-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ), <sup>£</sup>general significant difference between male and female animals, independently of genotype, SEP treatment and vessel segment (four-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ), <sup>@</sup>general significant difference between arterial segment type (THO vs. ABD), independently of sex, genotype and SEP treatment (four-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ). <sup>+</sup>significant interaction between sex and genotype (four-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ), indicating that mRNA levels were higher in *Eln*<sup>+/-</sup> than *Eln*<sup>+/+</sup> mice in males only, independently of SEP treatment (post hoc Fisher's Least Significant Difference (LSD) tests,  $p \leq 0.05$ ). <sup>++</sup>significant interaction between sex, genotype and artery segment (four-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ), indicating that the effect of genotype varies as a function of sex and artery segment (post hoc Fisher's Least Significant Difference (LSD) tests,  $p \leq 0.05$ ). Control animals were injected with the same volume of 0.9% NaCl (NaCl). Values are mean  $\pm$  SEM. n=5 in each group.

### 2.7. Aortic tissue protein levels

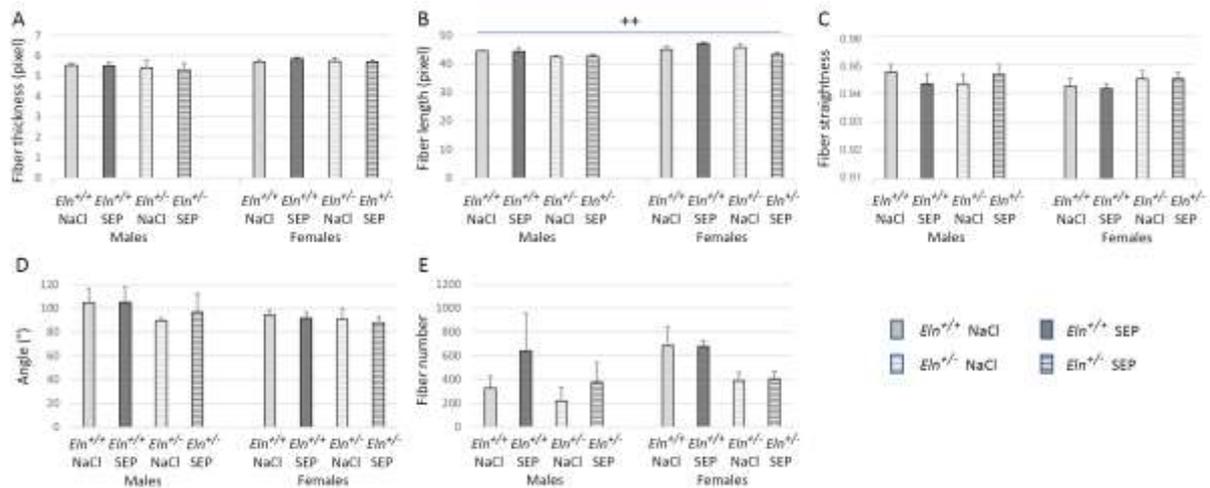
Western blotting of aorta extracts was performed for four major proteins involved in elastic fiber structure or synthesis: TE, FBN1, LOX and immature LOX (pre-LOX). Representative images are presented in Figure 10A of the main article. In the aorta wall, the levels of TE were generally found lower in *Eln*<sup>+/-</sup> than *Eln*<sup>+/+</sup> mice (Supplementary data S1.9A), while LOX levels were higher in *Eln*<sup>+/-</sup> than *Eln*<sup>+/+</sup> animals (Supplementary data S1.9C), independently of sex and treatment. In parallel, the levels of TE and LOX were generally lower in males than females (Supplementary data S1.9A,C), while the levels of pre-LOX were found higher in males than females (Supplementary data S1.9D), independently of genotype and treatment. Sex and genotype had no effect on FBN1 levels (Supplementary data S1.9B).



**Supplementary data S1.9.** Western blotting of descending thoracic aorta extracts from untreated or SEP-treated mice. Semi-quantitative analysis of the protein levels was performed by band densitometry for: A. tropoelastin

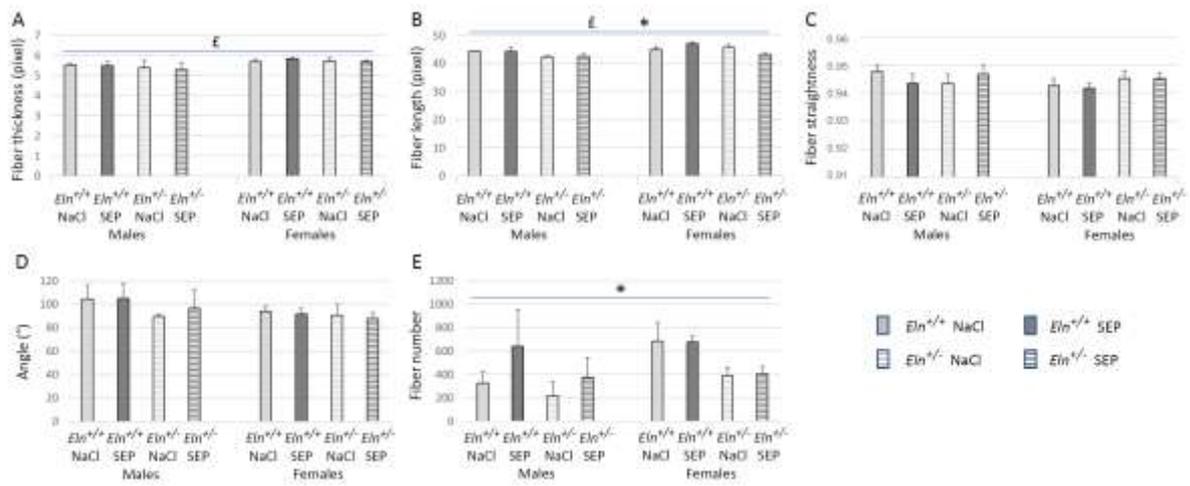
(TE), B. fibrillin-1 (FBN1), C. lysyl oxidase (LOX, 30kDa), D. immature lysyl oxidase (pre-LOX, 50kDa). \*general significant difference between *Eln*<sup>+/+</sup> and *Eln*<sup>-/-</sup> mice, independently of sex and SEP treatment (three-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ), <sup>£</sup>general significant difference between male and female mice, independently of genotype and SEP treatment (three-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ). Control animals were injected with the same volume of 0.9% NaCl (NaCl). Values are mean  $\pm$  SEM. n=5 in each group.

## Supplementary data S2



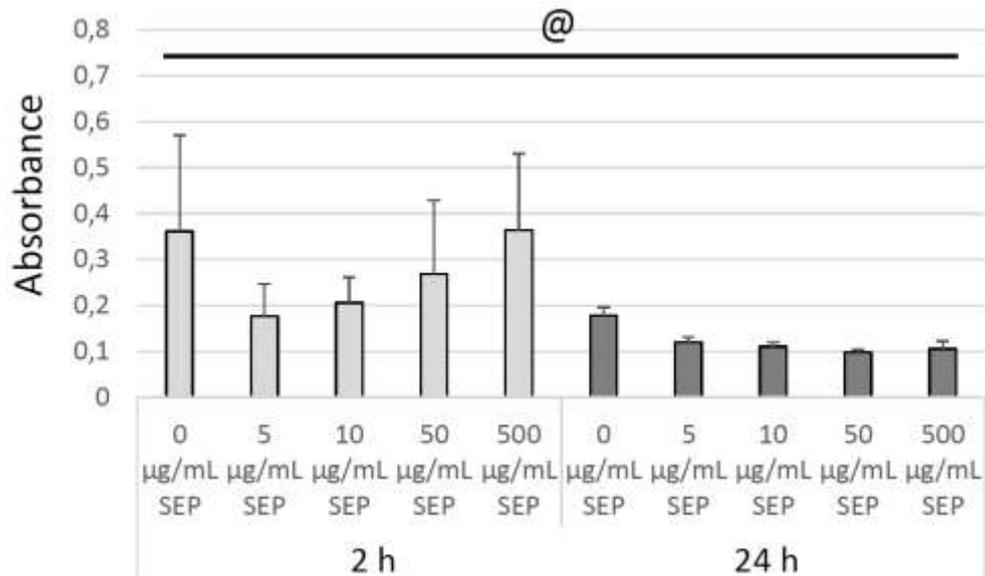
**Supplementary data S2.** CT-fire analysis of picrosirius red-stained cross-sections of the distal part of the aortic arch, restricted to the wall media, illuminated with polarized light: effect of SEP treatment. Individual properties and quantity of collagen fibers were compared between the studied groups: (A) fiber thickness, (B) length, (C) straightness, (D) angle and (E) number of fibers in the media per aorta. <sup>++</sup> significant interaction between genotype, sex and SEP treatment (three-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ), indicating that SEP treatment induced a collagen fiber length decrease in the aortic media of female *Eln*<sup>+/-</sup> and increase in female *Eln*<sup>+/+</sup> mice, while no change could be detected in male animals. Control animals were injected with the same volume of 0.9% NaCl (NaCl).  $n=3-6$  in each group.

## Supplementary data S3



**Supplementary data S3.** CT-FIRE analysis of picosirius red-stained cross-sections of the distal part of the aortic arch, restricted to the wall media, illuminated with polarized light: effects of genotype and sex. Individual properties and quantity of collagen fibers were compared between the studied groups: (A) fiber thickness, (B) length, (C) straightness, (D) angle and (E) number of fibers in the media per aorta. \* general significant difference between *Eln*<sup>+/+</sup> and *Eln*<sup>+/-</sup> mice, independently of sex and SEP treatment (three-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ). <sup>£</sup> general significant difference between male and female mice, independently of genotype and SEP treatment (three-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ). Control animals were injected with the same volume of 0.9% NaCl (NaCl).  $n=3-6$  in each group.

## Supplementary data S4



**Supplementary data S4.** ELISA detection of SEP-coated wells with anti-elastin antibodies. After 2h or 24h coating with SEP of wells from a 96-well plate, the same procedure as that described for detection of elastin in VSMC cultures was applied (see corresponding part of the materials and methods for details). The wells were coated with different concentrations of SEP (0, 5, 10, 50, 500 µg/mL) for 2h or 24h, then washed three times with 0.1% Tween containing PBS 1X. The primary antibodies to elastin (ab21610, Abcam), then the secondary antibodies coupled to HRP were applied to the wells, before chemical revelation and absorbance reading after 10 min. It was observed that the presence of SEP in the wells (5-500 µg/mL) did not significantly elevate the absorbance, compared to the wells with no SEP (0 µg/mL) (two-way ANOVA,  $p=0.73$ ). Absorbance was even reduced in the presence of SEP after a 24h coating, compared to the absence of coating (one-way ANOVA,  $p\leq 0.05$ ). It was concluded that the anti-elastin antibody did not recognize SEP. However, a general decrease in absorbance was detected between the two coating times, independently of the presence of SEP in the wells (@, two-way ANOVA,  $p\leq 0.05$ ).

## 1.2 Principaux résultats et discussion de l'article 1

De façon intéressante, cette étude confirme, comme nous nous y attendions, les caractéristiques morphologiques, structurelles et mécaniques atypiques déjà démontrées du cœur et de l'aorte ascendante de souris *Eln<sup>+/-</sup>* âgées de 6 mois, par rapport à leurs homologues de type sauvage : hypertrophie cardiaque, hypertension, diamètre aortique plus faible (et parois plus fines chez les mâles), aortes ascendantes plus longues et généralement plus rigides, bien que plus distensibles à basse pression et moins distensibles à haute pression, ainsi que des lames élastiques plus nombreuses, plus fines et plus dégradées (Mylène Pezet et al. 2008; D. Y. Li, Brooke, et al. 1998; Gilles Faury et al. 2003; Knutsen et al. 2018). Ces caractéristiques des souris *Eln<sup>+/-</sup>*, précédemment démontrées uniquement chez les mâles, ont aussi été démontrées ici comme étant présentes chez les femelles. En outre, un dysfonctionnement de l'endothélium - c'est-à-dire une diminution de la relaxation de l'aorte ascendante en réponse à l'Ach - est associé au génotype *Eln<sup>+/-</sup>* chez les femelles, et non chez les mâles, conformément à la réponse similaire à l'Ach des aortes ascendantes des souris mâles de 6 mois *Eln<sup>+/+</sup>* et *Eln<sup>+/-</sup>* observée précédemment (Mylène Pezet et al. 2008).

Concernant les effets de la SEP, notre étude montre que le traitement par la SEP diminue la rigidité accrue des aortes des souris *Eln<sup>+/-</sup>*, se rapprochant ainsi de la rigidité de l'aorte des animaux témoins (*Eln<sup>+/+</sup>*). Dans les expériences d'artériographie de pression, une réduction de la rigidité aortique induite par la SEP est observée chez tous les animaux, bien que cet effet soit de plus grande amplitude chez les souris *Eln<sup>+/-</sup>*, et en particulier chez les mâles. Le mécanisme moléculaire mis en œuvre n'est pas encore établi, mais l'augmentation de l'épaisseur des lames élastiques dans les aortes des animaux mâles des deux génotypes ajoutée à l'augmentation de la production d'élastine induite par la SEP *in vitro* par les CMLVs, en particulier celles des souris *Eln<sup>+/-</sup>* mâles, et les transcriptions de *fibrilline-1* dans le tissu aortique, suggèrent que cet épaississement des lames élastiques pourrait être dû à une néosynthèse de fibres élastiques, potentiellement accompagnée par l'intégration de la SEP dans les lames élastiques et à l'origine de l'effet bénéfique sur la rigidité artérielle.

De plus, alors que les lames élastiques des animaux *Eln<sup>+/-</sup>* présentent beaucoup plus de ruptures que celles des souris *Eln<sup>+/+</sup>*, une forte tendance à l'abolition de cette différence est observée après le traitement par la SEP. Par conséquent, cela suggère également un potentiel de la SEP pour réparer les fibres élastiques préexistantes, ce qui correspond à l'effet protecteur/restauratif déjà démontré sur les fibres élastiques du minoxidil et de l'extrait d'aneth, deux stimulateurs de la synthèse des fibres élastiques (Knutsen et al. 2018; Coquand-Gandit et al. 2017; W. Fhayli et al. 2019; Fhayli, Boëté et al. 2020), et pourrait également contribuer à l'amélioration des propriétés mécaniques de l'aorte induite par la SEP chez les souris *Eln<sup>+/-</sup>* mâles.

Le traitement par la SEP rétablit également la réponse vasodilatatrice à l'acétylcholine altérée des aortes des femelles *Eln<sup>+/-</sup>*. Comme une réponse vasodilatatrice similaire au SNP (donneur de NO non endothélial dépendant), agissant directement sur la relaxation des CMLVs, a été observée chez les mêmes animaux, nous avons pu conclure qu'un dysfonctionnement endothélial explique la réponse plus faible de l'aorte

ascendante des souris *Eln*<sup>+/-</sup> femelles au vasodilatateur NO-dépendant Ach. La restauration d'une réponse vasodilatatrice normale de ces animaux à l'Ach après le traitement par la SEP pourrait être expliquée par l'action vasodilatatrice déjà démontrée des séquences d'élastine se liant à l'ERC (G. Faury et al. 1994; 1995; G. Faury, Garnier, et al. 1998; D. Y. Li, Brooke, et al. 1998), puisque certaines de ces séquences, y compris VGVAPG, sont présentes dans la SEP.

Malgré un léger impact sur le poids du cœur, similaire à celui produit par le minoxidil (Coquand-Gandit et al. 2017; W. Fhayli et al. 2019), nos résultats indiquent donc que la SEP est une molécule multipotentielle modulant la prolifération des CMLVs et la production de tropoélastine-élastine/Lox/fibrilline-1, et induisant le renforcement des fibres élastiques chez les souris mâles des deux génotypes, l'abolition de la dysfonction endothéliale observée chez les souris *Eln*<sup>+/-</sup> femelles et une diminution générale de la rigidité de l'aorte ascendante pour tous les groupes d'animaux (laquelle est de plus grande amplitude chez les animaux *Eln*<sup>+/-</sup>, ce qui est l'objet de cette recherche). Comme nos résultats *in vivo* ont été obtenus après une seule injection de SEP, des études futures devraient vérifier, chez la souris, si une dose plus élevée et/ou des injections multiples de SEP pourraient induire une amélioration supérieure de la fonction artérielle, en particulier chez les femelles.

L'identification des mécanismes d'action de la SEP fera l'objet d'études ultérieures. Toutefois, l'une des hypothèses étant que la SEP puisse intégrer directement la paroi pour pouvoir réparer et/ou remplacer les fibres élastiques existantes, nous avons essayé d'identifier la présence de SEP dans la paroi de l'aorte ou, plus précisément, dans les lames élastiques. Cependant, à ce jour, du fait d'un manque de spécificité des anticorps capables de détecter la SEP, nous ne pouvons pas confirmer cette hypothèse (voir chapitre 6 de la discussion générale). Ainsi, sans exclure qu'une intégration directe de la SEP dans la paroi aortique et les fibres élastiques puisse se produire et participer aux effets bénéfiques observés, nous privilégions donc une seconde hypothèse d'une signalisation cellulaire de la SEP pour expliquer les changements observés dans les aortes des animaux. La SEP étant conçue pour contenir les mêmes sites de liaison que la tropoélastine concernant le complexe récepteur de l'élastine (ERC) et l'intégrine  $\alpha\beta_3$ , il est donc probable qu'un ou ces deux récepteurs soient impliqués dans le mécanisme d'action de la SEP.

Ainsi, nos résultats suggèrent que la SEP devrait être considérée comme un outil avec un potentiel intéressant dans de futurs essais visant à améliorer la fonction artérielle dans des pathologies humaines liées à une déficience en élastine, comme le syndrome de Williams-Beuren et, éventuellement les patients atteints de cutis laxa.

## 2 Axe hypoxie intermittente

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux effets de la SEP sur un modèle d'animaux exposés à l'hypoxie intermittente (HI), connu pour présenter des altérations du système cardiovasculaire (hypertension, épaisseur des parois artérielles, susceptibilité à l'athérosclérose) et, en particulier, présenter des fibres élastiques artérielles altérées (Lévy et al. 2015; Arnaud, Beguin, et al. 2011). Les souris ont été exposées à l'hypoxie intermittente (voir matériel et méthodes 1.3) ou à la normoxie (avec un stimulus identique de flux de gaz sans la valence hypoxique) durant 14 jours avant l'expérimentation. Nous avons utilisé 40 souris C57Bl/6J mâles et femelles âgées d'environ 6 mois (de 5 à 7 mois). L'injection de SEP ou d'une solution de NaCl (témoin) a été réalisée 3 jours avant les prélèvements, suivant le même protocole que pour les souris *Eln<sup>+/-</sup>* et *Eln<sup>+/-</sup>*.

### 2.1 Caractéristiques générales des animaux

La mesure du poids des cœurs des animaux exposés à l'hypoxie intermittente et celle des animaux témoins ainsi que les analyses statistiques des caractéristiques générales des animaux associées sont en cours et seront intégrées dans un article étudiant les effets de la SEP sur la structure/fonction artérielle des animaux exposés à l'hypoxie intermittente.

**Table 1 – Caractéristiques générales des animaux de l'axe hypoxie intermittente. Pcorps : poids corporel. Les valeurs sont des moyennes ± SEM. n = 5-7 par groupe.**

	Males				Femelles			
	Normoxiques		Hypoxiques		Normoxiques		Hypoxiques	
	TEMOINS	SEP	TEMOINS	SEP	TEMOINS	SEP	TEMOINS	SEP
<b>Pcorps avant HI (g)</b>	30.6 ± 1.1	31.6 ± 1.0	30 ± 0.7	30.4 ± 1.3	26.3 ± 1.2	24.7 ± 1.2	23.2 ± 0.8	23.0 ± 0.8
<b>Pcorps après HI (g)</b>	29.8 ± 1.1	30.0 ± 1.3	27.4 ± 0.6	27.0 ± 1.0	25.5 ± 0.8	24.0 ± 0.7	22.0 ± 0.7	22.0 ± 0.8
<b>Hématocrite (%)</b>	40.2 ± 0.6	38.2 ± 1.7	41.2 ± 0.9	38.3 ± 3.5	40.7 ± 0.9	40.4 ± 1.1	39.8 ± 0.7	40.0 ± 1.5

## 2.2 Pression artérielle et mesure de la vitesse d'onde de pouls

La mesure de la pression artérielle invasive ainsi que la mesure de la vitesse d'onde de pouls sont en cours d'expérimentation et seront intégrées dans un article étudiant les effets de la SEP sur la structure/fonction artérielle des animaux exposés à l'hypoxie intermittente.

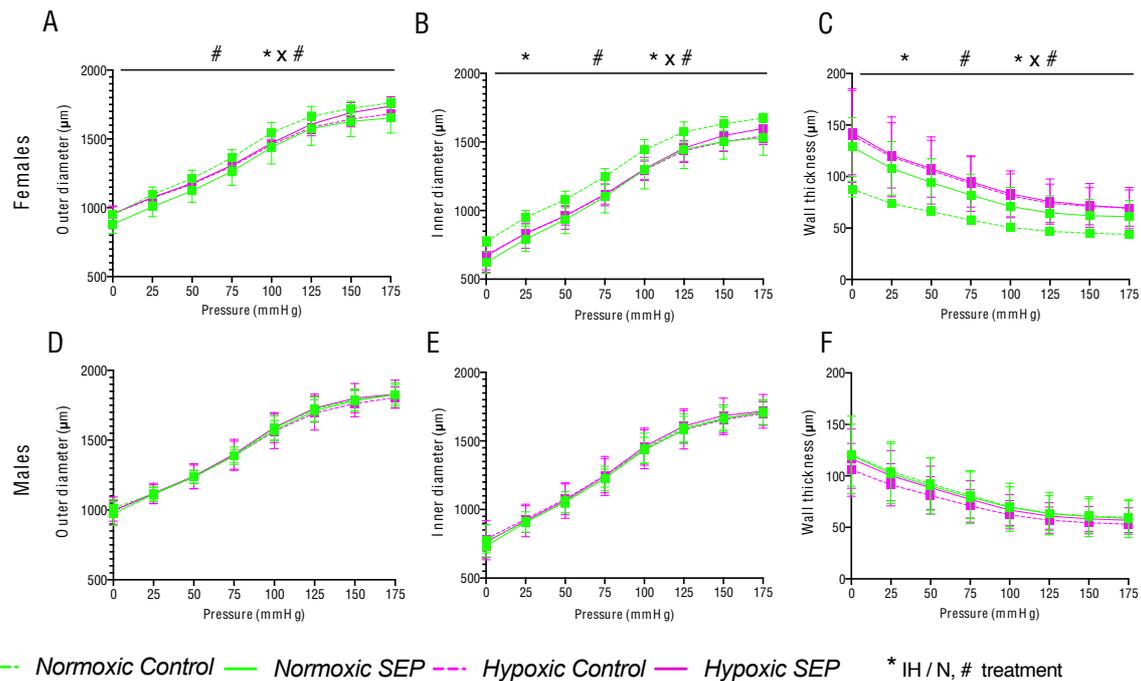
## 2.3 Résultats d'artériographie de pression

### 2.3.1 Aorte ascendante

Les études biomécaniques ex-vivo de l'aorte ascendante montrent que les diamètres externe (OD) et interne (ID) sont généralement plus grands chez les mâles que chez les femelles, indépendamment des conditions d'oxygénation et du traitement (ANOVA à quatre facteurs,  $p \leq 0,05$ ) tandis que globalement, les femelles présentent une épaisseur de la paroi supérieure à celle des mâles (ANOVA à quatre facteurs,  $p \leq 0,05$ ).

Il a également été observé une diminution générale de l'ID et de l'OD artériels chez les femelles hypoxiques témoins en comparaison des femelles normoxiques témoins. De plus, l'hypoxie intermittente augmente l'épaisseur de la paroi artérielle de façon globale chez les femelles uniquement, indépendamment du traitement (Figure 65).

Le traitement par la SEP augmente globalement l'épaisseur de la paroi aortique indépendamment des conditions d'oxygénation et du sexe (ANOVA à quatre facteurs,  $p \leq 0,05$ ) avec un effet plus marqué chez les femelles normoxiques (ANOVA trois facteurs,  $p \leq 0,05$ ). Enfin, le traitement par la SEP induit une diminution de l'OD et de l'ID chez les femelles normoxiques ainsi qu'une augmentation des diamètres internes et externes chez les femelles hypoxiques lorsque l'analyse est limitée aux hautes pressions (ANOVA trois facteurs sur 125-175 mmHg,  $p \leq 0,05$ ). Ainsi, au-delà de 125 mmHg, la SEP abolit la différence existante entre les animaux normoxiques et hypoxiques traités (Figure 65).



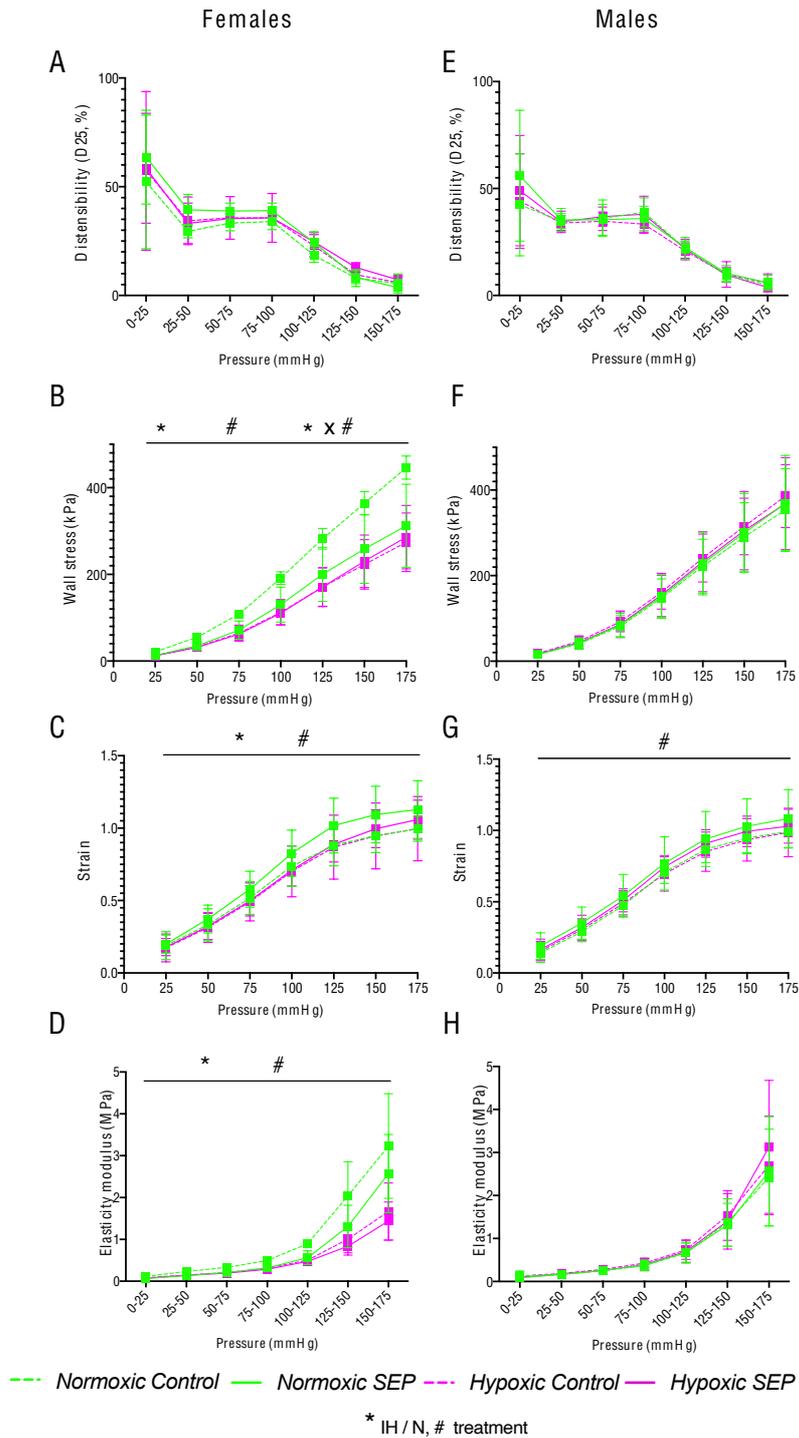
**Figure 65 - Courbes diamètre-pression et épaisseur de la paroi-pression de l'aorte ascendante de souris normoxiques ou exposées à une hypoxie intermittente.**

Les mesures ont été effectuées 3 jours après l'injection intraveineuse d'une solution de NaCl (témoin) ou de SEP dans la veine caudale de souris mâles (D-E) et femelles (A-C) C57Bl/6J exposées 14 jours à l'hypoxie intermittente (IH) ou à un flux intermittent d'air : Normoxiques (N) (A,D) Relation diamètre externe-pression ; (B,E) relation diamètre interne-pression ; (C,F) relation épaisseur de paroi-pression. \* Différence générale significative entre les conditions d'oxygénation (normoxiques vs. hypoxiques), (ANOVA à trois facteurs,  $p \leq 0,05$ ) #Effet général significatif du traitement (témoins NaCl vs. SEP) (ANOVA à trois facteurs,  $p \leq 0,05$ ) Lorsqu'une interaction entre plusieurs variables a été trouvée, elle a été indiquée dans la figure sous forme de produits de ces variables (par exemple : \* x #). L'analyse statistique a été effectuée en utilisant des ANOVA à trois facteurs, suivies si nécessaire par des tests "Least Significant Differences" de Fisher (LSD) pour les comparaisons appariées. Les différences ont été considérées comme significatives lorsque  $p \leq 0,05$ . Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SEM.  $n = 5-6$  par groupe.

L'étude des paramètres mécaniques montre que le stress circonférentiel ainsi que le module incrémental d'élasticité sont inférieurs chez les mâles que chez les femelles indépendamment du traitement et des conditions d'oxygénation (ANOVA quatre facteurs,  $p \leq 0,05$ ).

Chez les femelles hypoxiques, le stress circonférentiel de la paroi, inversement proportionnelle à l'épaisseur de la paroi, l'étirement ainsi que le module incrémental d'élasticité sont généralement plus faibles que pour les femelles normoxiques (Figure 66 B, C, D). Aucun effet significatif de l'hypoxie intermittente n'apparaît concernant les mâles (Figure 66E, F, G et H).

Le traitement des animaux par la SEP augmente l'étirement des vaisseaux indépendamment des conditions d'oxygénation et du sexe (Figure 66 C, G). De plus, la SEP tend à faire augmenter la distensibilité des vaisseaux indépendamment du sexe et des conditions d'oxygénation (ANOVA quatre facteurs,  $p=0,07$ ). Cette tendance devient significative chez les femelles lorsque l'analyse est restreinte aux hautes pressions (ANOVA trois facteurs sur 75-175 mmHg,  $p \leq 0,05$ ). De façon intéressante, la SEP diminue le stress circonférentiel de la paroi des aortes des femelles normoxiques (Figure 66B). Enfin, le module incrémental d'élasticité (Einc), indicateur de la rigidité du matériau de la paroi, est généralement et significativement diminué par le traitement SEP, uniquement pour les femelles, indépendamment des conditions d'oxygénation (Figure 66D).



**Figure 66 - Paramètres mécaniques de l'aorte ascendante de souris normoxiques ou exposées à une hypoxie intermittente.**

Les mesures ont été effectuées 3 jours après l'injection intraveineuse d'une solution de NaCl (témoins) ou de SEP dans la veine caudale de souris mâles (E-H) et femelles (A-D) C57Bl/6J exposées 15 jours à l'hypoxie intermittente (IH) ou à un flux intermittent d'air : Normoxiques (N) (A,E) évolution de la distensibilité aortique par incrément de pression ; (B,F) évolution du stress circonférentiel en fonction de la pression ; (C,G) évolution de l'éirement aortique (strain) en fonction de la pression ; (D,H) évolution du module incrémental d'élasticité (Einc) en fonction de l'incrément de pression. \* Différence générale significative entre les conditions d'oxygénation (normoxiques vs. hypoxiques), (ANOVA à trois facteurs,  $p \leq 0,05$ ) # Effet général significatif du traitement (témoins NaCl vs. SEP) (ANOVA à trois voies,  $p \leq 0,05$ ) \* x # interaction entre les conditions d'oxygénation et le traitement (ANOVA à trois voies,  $p \leq 0,05$ ). L'analyse statistique a été effectuée en utilisant des ANOVA à trois facteurs, suivies si nécessaire par des tests Least Significant Difference (LSD)s de Fisher pour les comparaisons deux à deux. Les différences ont été considérées comme significatives lorsque  $p \leq 0,05$ . Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SEM. n = 5-6 par groupe.

### 3 Axe vieillissement

Dans un troisième temps, nous nous sommes intéressés aux effets de la SEP sur un modèle d'animaux ayant subi un vieillissement important. Les expérimentations ont été menées sur des souris C57Bl/6J mâles et femelles âgées d'environ 24 mois (de 23 à 28 mois). L'injection d'une solution de SEP ou de son contrôle NaCl (témoin) a été réalisée 3 jours avant les prélèvements.

#### 3.1 Caractéristiques générales des animaux

La mesure du poids des cœurs des animaux âgés ainsi que les analyses statistiques des caractéristiques générales de ces animaux sont en cours et seront intégrés dans un article étudiant les effets de la SEP sur la structure/fonction artérielle des animaux âgés.

*Table 2 – Caractéristiques générales des animaux de l'axe vieillissement. Pcorps : poids corporel. Les valeurs sont des moyennes ± SEM. n = 8-9 par groupe.*

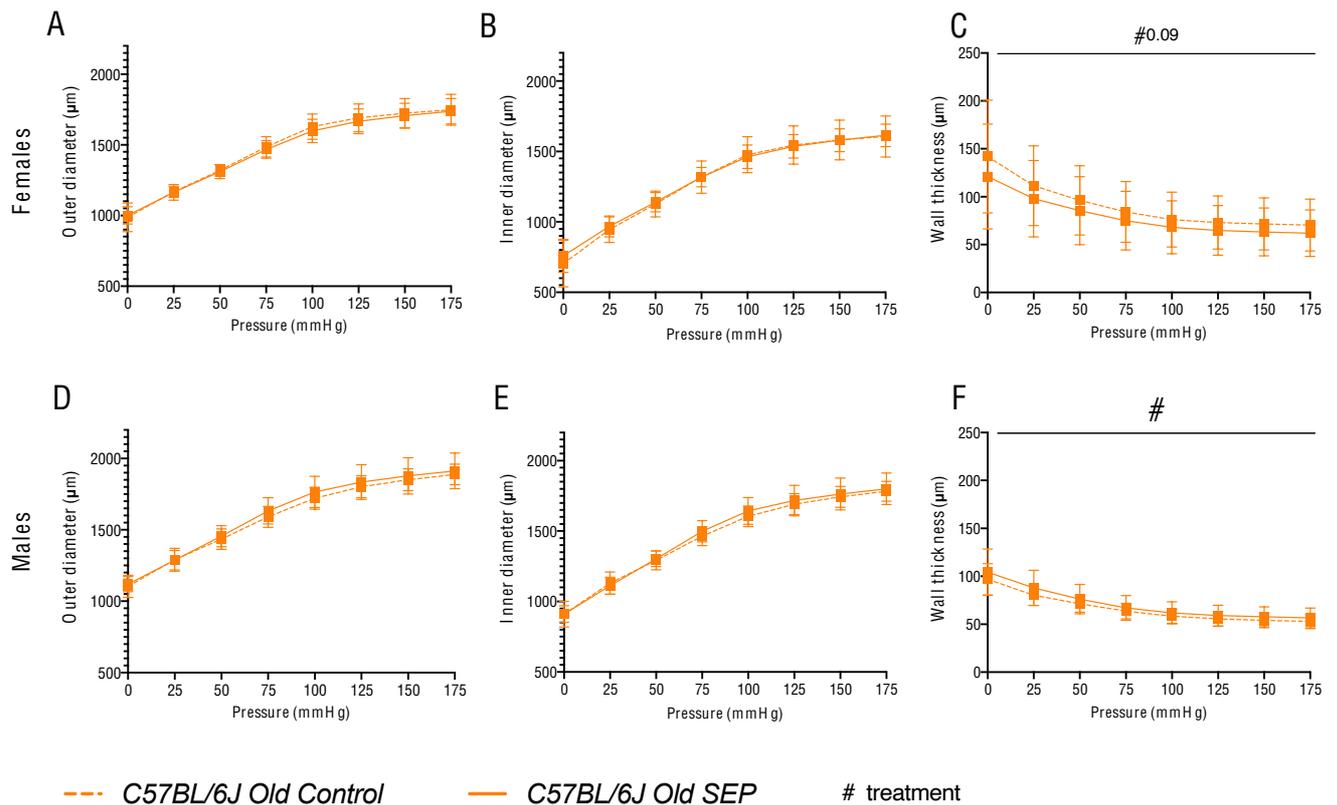
	<i>Mâles âgés</i>		<i>Femelles âgées</i>	
	TEMOIN	SEP	TEMOIN	SEP
<b>Pcorps (g)</b>	35.0 ± 0.9	34.6 ± 0.9	26.8 ± 0.4	27.5 ± 1.2
<b>Hématocrite (%)</b>	37.0 ± 0.9	37.3 ± 1.1	33.7 ± 1.0	28.7 ± 1.7

#### 3.2 Résultats d'artériographie de pression

##### 3.2.1 Aorte ascendante

Les études biomécaniques ex-vivo de l'aorte ascendante montrent que les diamètres externe (OD) et interne (ID) sont généralement plus grands chez les mâles que chez les femelles, indépendamment du traitement (ANOVA à quatre facteurs,  $p \leq 0,05$ ). Cependant, l'épaisseur de la paroi artérielle est supérieure pour les femelles âgées comparée à celle des mâles (ANOVA à quatre facteurs,  $p \leq 0,05$ ).

Le traitement des animaux par la SEP augmente l'épaisseur de la paroi aortique des mâles uniquement (Figure 67 F) (ANOVA à quatre facteurs,  $p \leq 0,05$ ) et tend à la faire diminuer chez les femelles (Figure 67 C) (ANOVA à trois facteurs,  $p = 0,09$ ).

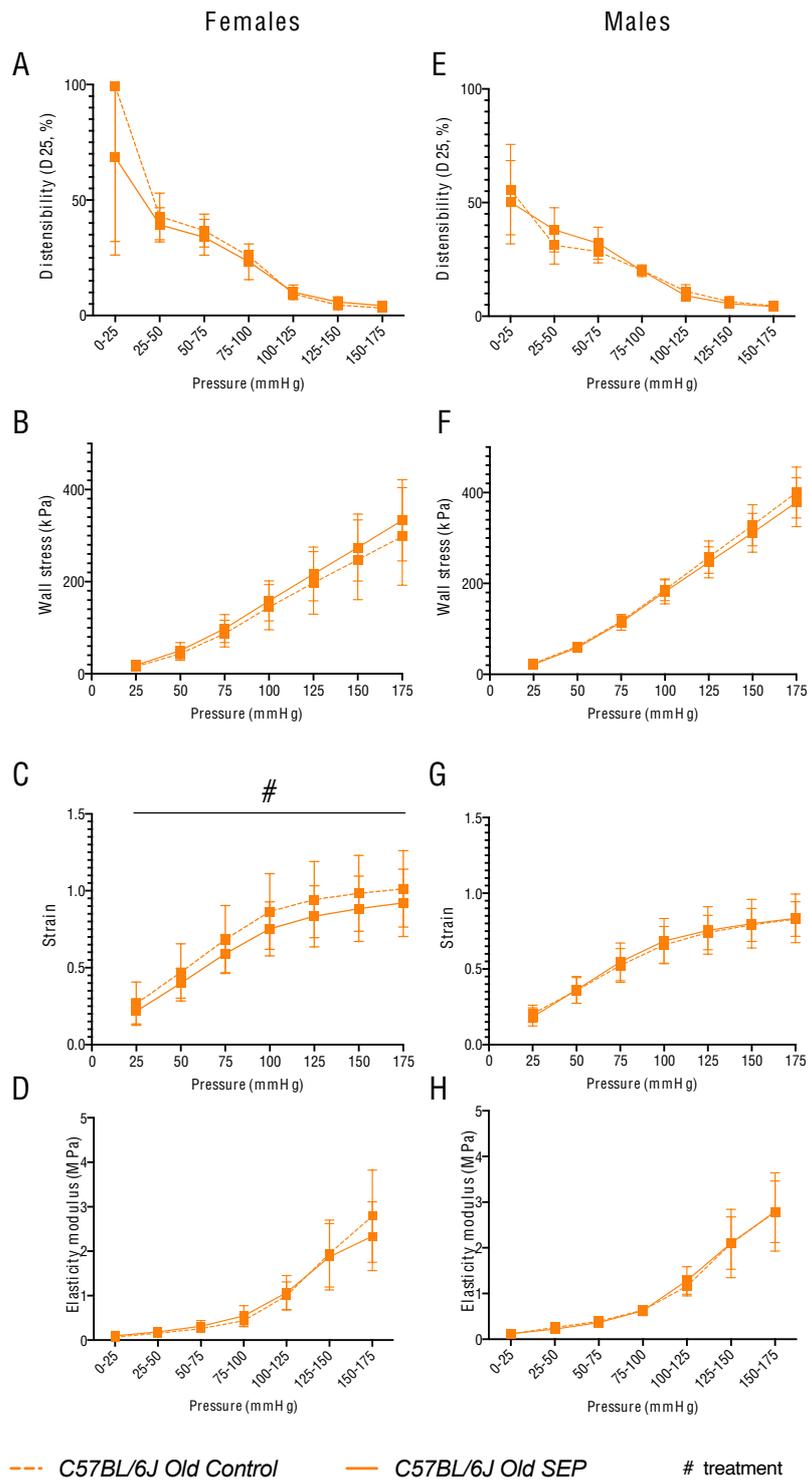


**Figure 67 - Courbes diamètre-pression et épaisseur de la paroi-pression de l'aorte ascendante de souris ayant subi un vieillissement important.**

Les mesures ont été effectuées 3 jours après l'injection intraveineuse d'une solution de NaCl (témoin) ou de SEP dans la veine caudale de souris mâles (D-F) et femelles (A-C) C57Bl/6J âgées de 23 à 28 mois (C57Bl/6J Old) (A,D) Relation diamètre externe-pression ; (B,E) relation diamètre interne-pression ; (C,F) relation épaisseur de paroi-pression. #Effet général significatif du traitement (témoin NaCl vs. SEP) (ANOVA à trois facteurs,  $p \leq 0,05$ ) L'analyse statistique a été effectuée en utilisant des ANOVA à trois facteurs, suivies si nécessaire par des tests Least Significant Difference (LSD) de Fisher pour les comparaisons deux à deux. Les différences ont été considérées comme significatives lorsque  $p \leq 0,05$ . Lorsqu'une tendance a été observée ( $p \leq 0,09$ ), la valeur de  $p$  a été indiquée dans la figure, à côté du symbole correspondant à la variable concernée ou à l'interaction entre variables. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SEM.  $n = 5-6$  par groupe.

L'étude des paramètres mécaniques montre que la distensibilité ainsi que l'étirement de la paroi est plus faible chez les mâles que chez les femelles indépendamment du traitement (ANOVA quatre facteurs,  $p \leq 0,05$ ). A contrario, le stress circonférentiel ainsi que le module incrémental d'élasticité ( $E_{inc}$ ) sont plus élevés chez les mâles que chez les femelles, indépendamment du traitement par la SEP (ANOVA quatre facteurs,  $p \leq 0,05$ ).

Le traitement des animaux par la SEP diminue l'étirement aortique chez les femelles âgées uniquement (Figure 68 C).



**Figure 68 - Paramètres mécaniques de l'aorte ascendante de souris ayant subi un vieillissement important. Les mesures ont été effectuées 3 jours après l'injection intraveineuse de NaCl (contrôle) ou de SEP dans la veine caudale de souris mâles (E-H) et femelles (A-D) C57Bl/6J âgées de 23 à 28 mois (C57Bl/6J Old) (A,E) évolution de la distensibilité aortique par incrément de pression ; (B,F) évolution du stress circonférentiel en fonction de la pression ; (C,G) évolution de l'étirement aortique (strain) en fonction de la pression ; (D,H) évolution du module incrémental d'élasticité (Einc) en fonction de l'incrément de pression # Effet général significatif du traitement (témoin NaCl vs. SEP) (ANOVA à trois facteurs,  $p \leq 0,05$ ). L'analyse statistique a été effectuée en utilisant des ANOVA à trois facteurs, suivies si nécessaire par des tests Least Significant Difference (LSD)s de Fisher pour les comparaisons deux à deux. Les différences ont été considérées comme significatives lorsque  $p \leq 0,05$ . Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SEM.  $n = 5-6$  par groupe**

## 4 Axe multifactoriel déficience génétique et vieillissement

Nous avons également pu travailler et tester l'efficacité du traitement sur un modèle mixte combinant deux des conditions d'altération des fibres élastiques étudiées : des animaux âgés déficients génétiquement en élastine. Nos travaux ont porté sur 8 groupes d'animaux. 28 souris mâles et femelles âgées d'environ 24 mois (de 23 à 28 mois), *Eln*<sup>+/+</sup> et *Eln*<sup>+/-</sup>, qui sont soit traités par la SEP (groupes SEP) soit injectés au NaCl (groupes contrôle).

### 4.1 Caractéristiques générales des animaux

La mesure du poids des cœurs des animaux âgés et génétiquement déficients pour l'élastine ainsi que les analyses statistiques des caractéristiques générales de ces animaux sont en cours et seront intégrées dans un article étudiant les effets de la SEP sur la structure/fonction artérielle des animaux âgés.

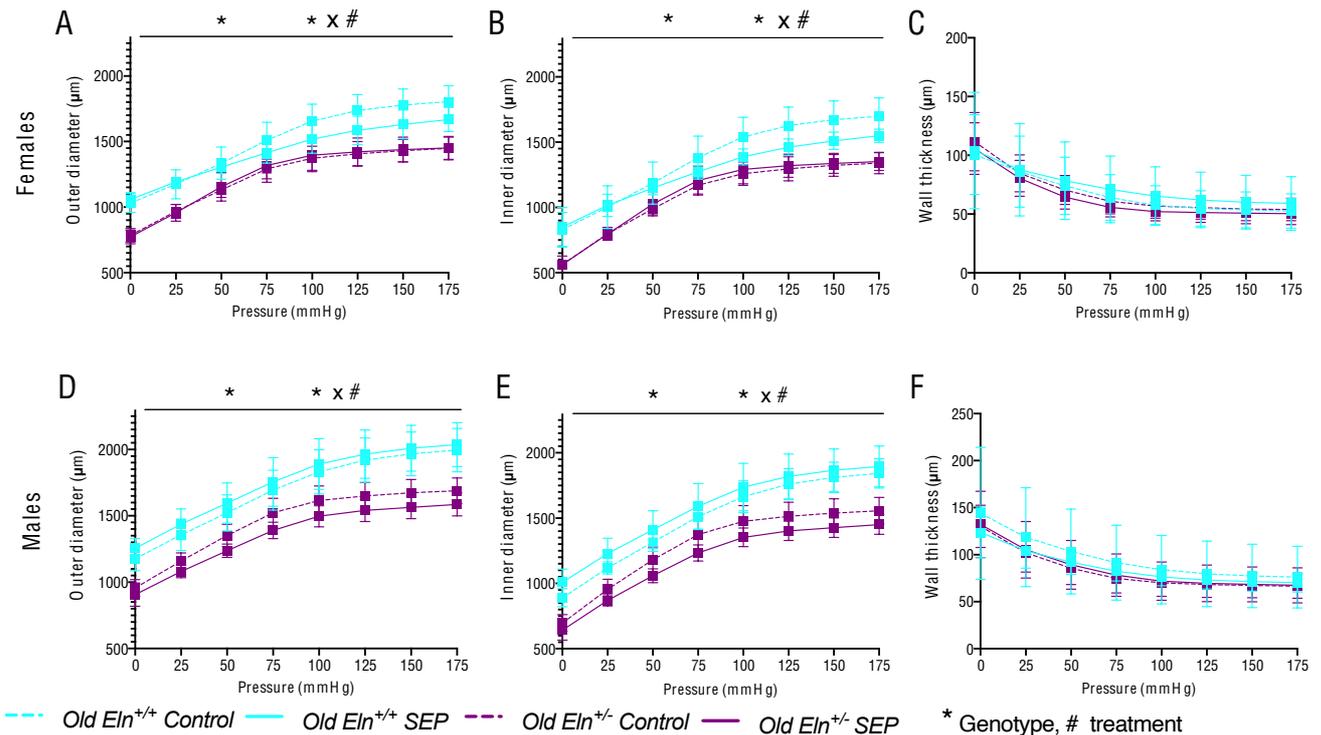
**Table 3 -Caractéristiques générales des animaux de l'axe multifactoriel déficience génétique et vieillissement. Pcorps : poids corporel. Les valeurs sont des moyennes ± SEM. n = 4-6 par groupe.**

	Males				Femelles			
	<i>Eln</i> <sup>+/+</sup> âgés		<i>Eln</i> <sup>+/-</sup> âgés		<i>Eln</i> <sup>+/+</sup> âgés		<i>Eln</i> <sup>+/-</sup> âgés	
	TEMOIN	SEP	TEMOIN	SEP	TEMOIN	SEP	TEMOIN	SEP
<b>Pcorps (g)</b>	38.4 ± 3.0	37.1 ± 1.0	42.2 ± 1.4	39.8 ± 1.6	30.7 ± 1.5	32.1 ± 3.9	30.1 ± 4.4	29.8 ± 1.0
<b>Hématocrite (%)</b>	36.8 ± 1.46	37.3 ± 0.8	36.5 ± 1.6	38.8 ± 0.8	34.7 ± 1.2	36.0 ± 2.3	41.6 ± 2.6	32.0 ± 2.0

### 4.2 Résultats d'artériographie de pression

Les études biomécaniques *ex-vivo* de l'aorte ascendante montrent que les diamètres externe (OD), interne (ID) et l'épaisseur de la paroi artérielle sont généralement plus grands chez les mâles que chez les femelles, indépendamment du génotype et du traitement (ANOVA à quatre facteurs,  $p \leq 0,05$ ). De même, chez les souris *Eln*<sup>+/-</sup> des deux sexes il a été observé une diminution générale, de l'ID et de l'OD (Figure 69 A, B, D, E).

Le traitement par la SEP provoque une diminution des diamètres externes et internes chez les femelles *Eln*<sup>+/+</sup> ainsi que chez les mâles *Eln*<sup>+/-</sup>, par comparaison aux animaux non-traités correspondants. La SEP augmente au contraire les diamètres internes des mâles *Eln*<sup>+/+</sup> (Figure 69 E). Aucun effet de la SEP n'est observé concernant une variation de l'épaisseur de la paroi artérielle.



**Figure 69 - Courbes diamètre-pression et épaisseur de la paroi-pression de l'aorte ascendante de souris  $Eln^{+/+}$  et  $Eln^{+/-}$  ayant subi un vieillissement important.** Les mesures ont été effectuées 3 jours après l'injection intraveineuse d'une solution de NaCl (témoin) ou de SEP dans la veine caudale de souris mâles (D-F) et femelles (A-C) de génotype  $Eln^{+/+}$  ou  $Eln^{+/-}$  âgées de 23 à 28 mois. (A,D) Relation diamètre externe-pression ; (B,E) relation diamètre interne-pression ; (C,F) relation épaisseur de paroi-pression. \* Différence générale significative entre les génotypes ( $Eln^{+/+}$  vs.  $Eln^{+/-}$ ), (ANOVA à trois facteurs,  $p \leq 0,05$ ) #Effet général significatif du traitement (témoin NaCl vs. SEP) (ANOVA à trois facteurs,  $p \leq 0,05$ ). Lorsqu'une interaction entre plusieurs variables a été trouvée, elle a été indiquée dans la figure sous forme de produits de ces variables (par exemple : \* x #). L'analyse statistique a été effectuée en utilisant des ANOVA à trois facteurs, suivies si nécessaire par des tests Least Significant Difference (LSD)s de Fisher pour les comparaisons deux à deux. Les différences ont été considérées comme significatives lorsque  $p \leq 0,05$ . Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SEM.  $n = 3-5$  par groupe.

Chez les animaux  $Eln^{+/-}$  des deux sexes, la distensibilité (D25) est augmentée à faible pression intraluminaire et diminuée aux pressions les plus élevées par rapport à celle des souris  $Eln^{+/+}$  correspondantes (Figure 70 A, E). Le stress circonférentiel, inversement proportionnelle à l'épaisseur de la paroi, est généralement plus faible à la

fois chez les animaux  $Eln^{+/-}$  comparés aux animaux  $Eln^{+/+}$  et chez les mâles en comparaison des femelles (ANOVA à quatre facteurs,  $p \leq 0,05$ ) (Figure 70B, F). L'étirement de la paroi (wall strain), quant à elle, est plus élevée chez les animaux haploinsuffisants pour l'élastine que chez les souris de type sauvage, ainsi que chez les femelles en comparaison des mâles (ANOVA à quatre facteurs,  $p \leq 0,05$ ) (Figure 70

C, G). Le module incrémental d'élasticité (Einc), indiquant la rigidité du matériau de la paroi, est comme attendu généralement et significativement augmenté chez les souris  $Eln^{+/-}$  des deux sexes indépendamment du traitement (ANOVA à quatre facteurs,  $p \leq 0,05$ ) (Figure 70D, H).

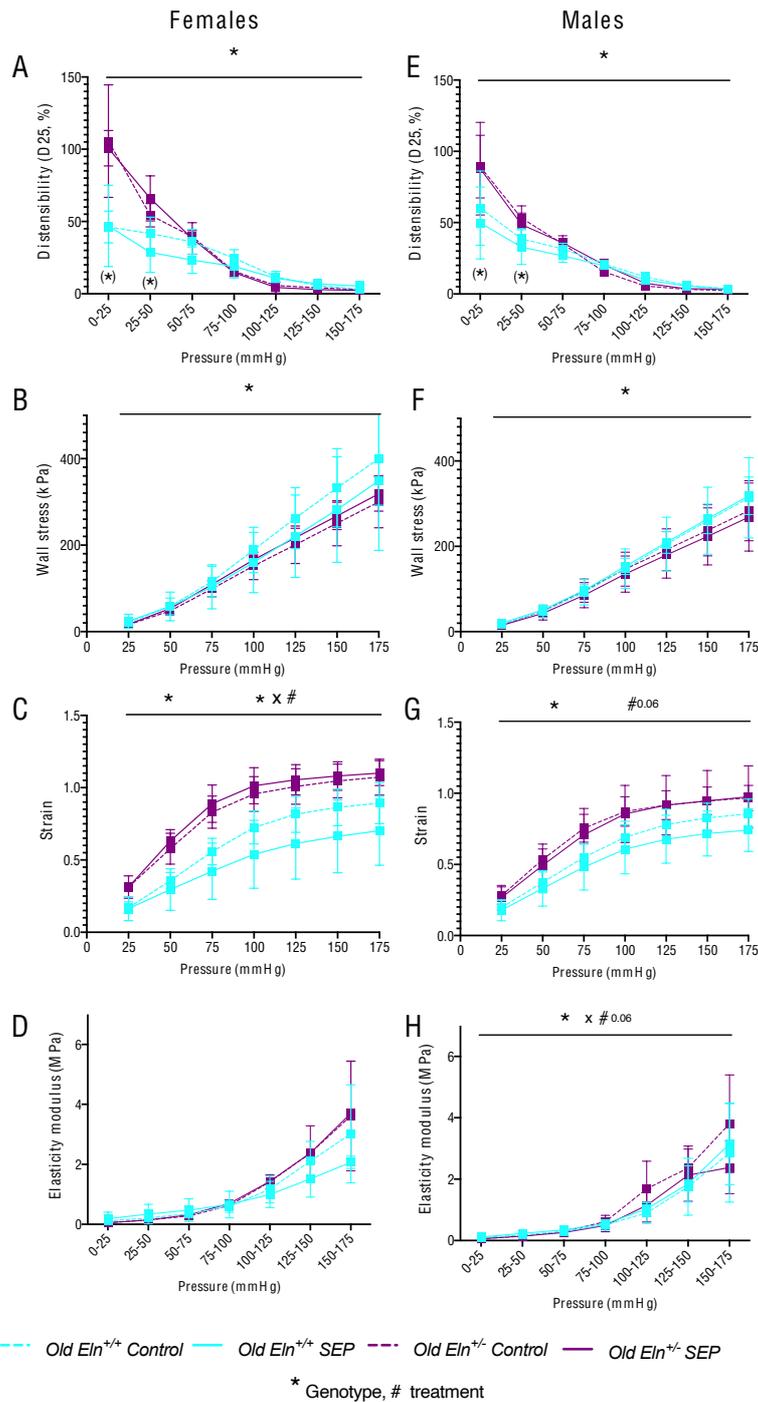
Aucune amélioration significative de la distensibilité aortique ou de la contrainte de paroi circonférentielle n'a été observée dans l'aorte des souris traitées par la SEP par

rapport à celle des souris non-traitées. En revanche, le traitement par la SEP diminue significativement l'étirement aortique chez les femelles  $Eln^{+/+}$  en comparaison de leurs

témoins non traités. De même, la SEP tend à globalement induire les mêmes effets chez les mâles indépendamment du génotype (ANOVA à quatre facteurs,  $p = 0,06$ )

(Figure 70 C, G).

De façon intéressante, l'Einc de l'aorte tend à diminuer chez les mâles *Eln<sup>+/-</sup>* traités avec la SEP par rapport aux mâles non-traités, tendant ainsi à abolir la différence qui existe entre les génotypes (ANOVA à trois facteurs,  $p=0,06$ ). Cette tendance devient significative lorsque l'analyse est restreinte aux hautes pressions (ANOVA à trois facteurs sur 75-175 mmHg,  $p\leq 0,05$ ).



**Figure 70 - Paramètres mécaniques de l'aorte ascendante de souris  $Eln^{+/+}$  et  $Eln^{-/-}$  ayant subi un vieillissement important.**

Les mesures ont été effectuées 3 jours après l'injection intraveineuse d'une solution de NaCl (témoin) ou de SEP dans la veine caudale de souris mâles (E-H) et femelles (A-D) de génotype  $Eln^{+/+}$  ou  $Eln^{-/-}$  âgées de 23 à 28 mois. (A, E) relation distensibilité aortique-incrément de pression ; (B, F) relation stress circonférentiel-pression ; (C, G) relation étirement (strain) aortique-pression ; (D, H) relation module élastique incrémental (Einc)-incrément de pression. \* Différence générale significative entre les génotypes ( $Eln^{+/+}$  vs  $Eln^{-/-}$ ), (ANOVA à trois facteurs,  $p \leq 0,05$ ) # Effet général significatif du traitement (témoin NaCl vs SEP) (ANOVA à trois facteurs,  $p \leq 0,05$ ) (\*) Différence significative à une pression spécifique entre les souris  $Eln^{+/+}$  et  $Eln^{-/-}$  (ANOVA à trois facteurs,  $p \leq 0,05$ ). Lorsque des interactions entre plusieurs variables ont été trouvées, elles ont été indiquées dans la figure comme produits de ces variables (par exemple : \* x #). L'analyse statistique a été effectuée en utilisant des ANOVA à trois ou quatre facteurs, suivies si nécessaire par les tests Least Significant Difference (LSD) de Fisher pour les comparaisons deux à deux. Les différences ont été considérées comme significatives lorsque  $p \leq 0,05$ . Lorsqu'une tendance forte a été observée ( $p \leq 0,06$ ), la valeur de p a été indiquée dans la figure, à côté du symbole correspondant à la variable concernée ou à l'interaction entre variables. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SEM.  $n = 3-5$  par groupe.

## 5 Projets complémentaires

En parallèle de l'étude des effets de la SEP sur différentes pathologies altérant les fibres élastiques, j'ai pu participer à d'autres projets de recherche en lien avec mon sujet de thèse ayant abouti à des publications au cours de la thèse ou qui seront prochainement soumis pour publications.

Premièrement, j'ai participé à la rédaction d'une revue concernant la synthèse et la dégradation des fibres élastiques du développement au vieillissement publiée en 2019 dans le journal *Matrix Biology* (IF = 11.6) dont je suis co-premier auteur et qui aura été une solide base pour la rédaction de l'introduction de cette thèse (Annexe 1).

Dans un deuxième temps, j'ai pu collaborer d'un point de vue expérimental et rédactionnel à une étude visant à évaluer l'efficacité d'un alicament, l'aneth, avec le même objectif que pour la SEP, restaurer l'élasticité artérielle, qui dans ce deuxième cas est dégradée lors du vieillissement. Cette collaboration a d'ores et déjà abouti à la publication d'un article publié dans *Biomolécules* en 2020 (IF = 6 ; voir chapitre 5.1).

Enfin, en parallèle des périodes d'expérimentations, notre équipe a réalisé un travail de méta-analyse inédit tentant de faire la lumière sur l'effet de l'hypoxie intermittente sur le réseau cardio-vasculaire dans les différents modèles expérimentaux. En effet, en fonction des études, les effets de l'hypoxie intermittente sont parfois contradictoires et difficilement analysables. L'objectif de notre travail a été de caractériser ces effets à partir des données exhaustives de la littérature et de tenter d'en tirer des conclusions sur les effets physiopathologiques sur des modèles animaux, notamment en termes de protocole d'exposition. Ce travail a abouti à la publication d'un article publié en 2021 dans *l'European respiratory journal* (IF = 33.8 ; voir chapitre 5.2).

## 5.1 Article 2 : L'extrait d'aneth induit la néosynthèse de fibres élastiques et une amélioration fonctionnelle de l'aorte ascendante de souris âgées, avec réversion de l'hypertrophie cardiaque liée à l'âge et implication de la lysyl oxidase-like-1.

### 5.1.1 Présentation de l'article

Dans cette étude (Wassim Fhayli et al. 2020), l'ingestion d'une solution d'extrait d'aneth (*Anethum graveolens*) est testée sur modèle murin afin d'évaluer son impact sur la production d'élastine au niveau cardiovasculaire. Différentes études ont montré un potentiel intéressant de l'extrait d'aneth comme inducteur de l'élastogénèse sur la peau.

L'aneth est un membre de la famille des Apiacées possédant des propriétés culinaires et médicinales. Traditionnellement, elle est utilisée en médecine ayurvédique (médecines traditionnelles Indienne) pour soulager l'inconfort digestif (indigestion, inconfort abdominal) particulièrement la douleur colique chez le nouveau-né et la flatulence chez les jeunes enfants, les troubles respiratoires mais aussi la réduction du cholestérol et du glucose (S. Jana et Shekhawat 2010; Goodarzi et al. 2016; Sadeghi et al. 2022). Différentes études lui ont également attribués des effets antibactériens (Sonali Jana et Shekhawat 2010), antioxydants, hypoglycémiant ou encore hypolipémiante (Goodarzi et al. 2016; Sadeghi et al. 2022).

A l'instar du céleri, du persil, du fenouil, de la coriandre ou encore de la dentelle de la Reine Anne, l'aneth est un membre de la famille des Apiacées, le nom latin de l'aneth européen est *Anethum graveolens* (Sadeghi et al. 2022). L'aneth peut atteindre une taille de 1,2m dans des conditions idéales de culture et sa floraison est annuelle. Il s'agit d'une plante aux feuilles vert-pales très finement découpées et à la tige mince, sa floraison a lieu en juillet où elle présente alors de petites fleurs jaunes groupées à son sommet. Les graines, quant à elles, sont ovales (2,5 mm de longueur) et sont récoltés à la fin du cycle de vie de la plante (S. Jana et Shekhawat 2010).

Le criblage phytochimique de la plante d'aneth montre que les feuilles, la tige et les racines sont riches en terpènes, glycosides cardiotoniques et flavonoïdes (Figure 71) (S. Jana et Shekhawat 2010)

Metabolites	Seeds	Leaves	Roots
Tannins	+	+	+
Terpenoid	+	+	+
Saponins	+	-	+
Steroid	-	+	+
Flavonoid	+	+	+
Phlobatannin	-	-	-
Cardiac-Glycoside	+	+	+
Antraquinone	+	-	-

Figure 71 - Analyse phytochimique des graines, feuilles et racines d'aneth (Jana et Shekhawat, 2010).

Concernant les propriétés d'inducteur de l'élastogénèse de l'aneth, Cenizo et ses collaborateurs ont montré que l'application d'extrait d'aneth sur des fibroblastes en culture induit une augmentation significative du taux d'ARNm de LOXL (responsable

de la réticulation des molécules de TE). De plus, le traitement de ces cultures cellulaires par l'aneth augmente significativement le dépôt d'élastine dans des modèles de peau reconstruite (Cenizo et al. 2006). Une étude clinique a également été réalisée par l'équipe de Sohm portant sur l'application d'extrait d'aneth sur le visage de 50 femmes âgées de 43 à 56 ans. Cette étude conclut à une augmentation de l'élasticité de la peau de ces femmes ainsi qu'un lissage des rides (Sohm et al. 2011). Enfin, une étude plus récente montre que l'administration d'aneth induit l'augmentation de l'expression des gènes de l'élastine, du collagène et de LOXL1, permettant d'améliorer la réticulation des fibres élastiques dans des explants de peau humaine (Meza et al. 2020).

Dans cette étude, nous comparons l'effet d'un traitement chronique (3 mois) par l'extrait d'aneth à 5% et 10% dans l'eau de boisson sur la structure et la fonction de l'aorte ascendante de souris mâles âgées de 24 mois.



Article

# Dill Extract Induces Elastic Fiber Neosynthesis and Functional Improvement in the Ascending Aorta of Aged Mice with Reversal of Age-Dependent Cardiac Hypertrophy and Involvement of Lysyl Oxidase-Like-1

Wassim Fhayli <sup>1</sup>, Quentin Boëté <sup>1</sup>, Nadjib Kihal <sup>2</sup>, Valérie Cenizo <sup>3</sup>, Pascal Sommer <sup>4</sup>,  
Walter A. Boyle <sup>5</sup>, Marie-Paule Jacob <sup>6</sup> and Gilles Faury <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Univ. Grenoble Alpes, Inserm, CHU Grenoble Alpes, HP2, 38000 Grenoble, France; wassimfhayli@gmail.com (W.F.); boete.quentin@gmail.com (Q.B.)

<sup>2</sup> Laboratoire de Phytochimie et de Pharmacologie, Département de Chimie, Université de Jijel, Jijel 18000, Algeria; nadjib.kihal@icloud.com

<sup>3</sup> L'Occitane en Provence, 04100 Manosque, France; val.cenizo@gmail.com

<sup>4</sup> Institut de Biologie et Chimie des Protéines UMR5305—LBTI, CNRS, 69367 Lyon, France; pascal.sommer@univ-amu.fr

<sup>5</sup> Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine Division, Washington University School of Medicine, St Louis, MO 63110, USA; boylew@wustl.edu

<sup>6</sup> INSERM, U1148, and Hopital Bichat-Claude Bernard, 75018 Paris, France; marie-paule.jacob@orange.fr

\* Correspondence: gilles.fauy@univ-grenoble-alpes.fr; Tel.: +33-4-76-63-75-39

Received: 30 October 2019; Accepted: 14 January 2020; Published: 23 January 2020



**Abstract:** Elastic fibers (90% elastin, 10% fibrillin-rich microfibrils) are synthesized only in early life and adolescence mainly by the vascular smooth muscle cells through the cross-linking of its soluble precursor, tropoelastin. Elastic fibers endow the large elastic arteries with resilience and elasticity. Normal vascular aging is associated with arterial remodeling and stiffening, especially due to the end of production and degradation of elastic fibers, leading to altered cardiovascular function. Several pharmacological treatments stimulate the production of elastin and elastic fibers. In particular, dill extract (DE) has been demonstrated to stimulate elastin production *in vitro* in dermal equivalent models and in skin fibroblasts to increase lysyl oxidase-like-1 (LOXL-1) gene expression, an enzyme contributing to tropoelastin crosslinking and elastin formation. Here, we have investigated the effects of a chronic treatment (three months) of aged male mice with DE (5% or 10% *v/v*, in drinking water) on the structure and function of the ascending aorta. DE treatment, especially at 10%, of aged mice protected pre-existing elastic lamellae, reactivated tropoelastin and LOXL-1 expressions, induced elastic fiber neo-synthesis, and decreased the stiffness of the aging aortic wall, probably explaining the reversal of the age-related cardiac hypertrophy also observed following the treatment. DE could thus be considered as an anti-aging product for the cardiovascular system.

**Keywords:** ascending aorta; elastic fibers; dill extract; lysyl oxidase-like-1 (LOXL-1); arterial mechanics; aging

## 1. Introduction

Elastic fibers, composed of an elastin core (90%) surrounded by fibrillin-rich microfibrils (10%), are essential extracellular matrix (ECM) macromolecules endowing extensible tissues with critical mechanical properties such as resilience, flexibility, and elasticity. Elastic fibers, mainly arranged into

concentric elastic lamellae in the arterial wall, are responsible for the main part of the elastic properties of the large arteries, i.e., the aorta and its main branches [1–4]. The mechanics of the large elastic arteries is one of the principal contributors to appropriate hemodynamics since the main role of central arteries is to cushion the oscillations of the blood pressure and flow, produced by the discontinuous ventricular ejection. During systole, the distension of the aorta and its proximal branches allows for the storage of both ~50% of the left ventricle stroke volume and energy in the extended elastic fibers [5]. During diastole, the arterial wall elastic fibers, returning to their relaxed state, release the accumulated energy, applying pressure to the blood which forwards the stored blood volume to the peripheral circulation. This maintains a relatively elevated arterial blood pressure and flow during diastole. This cushioning phenomenon, called the Windkessel effect, helps to decrease the heart afterload, smoothens the pressure changes in the arterial circulation, and generates a more continuous peripheral blood flow [4–9]. Aging and genetic deficiency in elastin or microfibrils lead to serious alterations of the arterial physiology and/or pathologies such as Williams or Marfan syndromes [4,6,10–13].

Elastin, accounting for an important part of the artery wall weight (> 50% of the dry weight of the ascending aorta wall), results from the cross-linking by lysyl-oxidase (LOX) and lysyl-oxidase-like-1 (LOXL-1) of its soluble precursor, tropoelastin. Tropoelastin is essentially synthesized by the vascular smooth muscle cells (VSMCs) only in early life and adolescence. No -or extremely limited- production of elastin and elastic fibers, i.e., elastogenesis, takes place in adult or aged human beings or animals [2,4,6,13–18]. Therefore, from their maximum quantity and integrity existing after childhood, elastin and elastic fibers are progressively degraded during aging by mechanical (fatigue) and enzymatic (e.g., matrix metalloproteases-MMPs-, cathepsins) processes [19–22]. As elastin gradually fails, its load-bearing function is taken over by collagen, with an increased collagen/elastin ratio, resulting in increased arterial stiffness and decreased arterial distensibility, as observed in the aging processes [4,23–25]. Several additional age-dependent mechanisms also contribute to arterial stiffening, including medial calcification and lipid deposition, which both take place, for an important part, within the elastic fibers [4,26]. Vascular stiffening causes arterial wave reflexions at the end of systole rather than during diastole, therefore increasing systolic and decreasing diastolic blood pressures, thus increasing pulse pressure [27]. The elevation of the systolic blood pressure increases the systolic workload of the left ventricle (LV), leading to increased oxygen consumption, LV hypertrophy, and interstitial fibrosis. All of these events predispose to the development of age-related heart failure [4,28].

Many therapeutical strategies, either non-pharmacological (exercise training, weight loss, or specific diets) or pharmacological (anti-hypertensive treatments, lipid-lowering agents, AGEs breakers) have been evaluated for their capacity to limit the age-related arterial stiffening. Some of these drugs have presented some positive effects by acting through a modulation of arterial fibrosis or smooth muscle cell contractility or by less understood mechanisms [28]. Recently, different pharmacological treatments targeting the enhancement of elastin production and elastic fiber assembly have been evaluated [4]. Several ATP-dependent potassium channel openers, including minoxidil, or their derivatives, have been shown, in vitro or in vivo in VSMCs or arteries of rats or mice, to promote elastic fiber neosynthesis and/or elastin LOX or LOXL-1 expressions [29–36]. Dill extract (DE) has been shown to increase skin elasticity in women [37] and, in vitro, lysyl oxidase-like-1 (LOXL-1) gene expression in skin fibroblasts and elastin production in dermal equivalent models [38]. This is of particular importance since LOXL-1 initiates covalent crosslinking of the elastin precursor (tropoelastin) molecules, which is a crucial step of normal elastin maturation [2,39]. As reported here, we have investigated the impact of a three-month treatment with DE on elastin production, protection or recovery of elastic fibers, and arterial structure and function in aged mice, which normally no longer produce elastic fibers. Our results indicate that DE treatment reverses age-related cardiac hypertrophy, protects elastic lamellae (EL), reactivates elastin and elastic fiber synthesis, and improves the biomechanical properties of the aging aortic wall.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animals

Twenty-six aged C57BL6/J male mice (24–25 months of age) were used: 10 in the untreated group (control), 8 in the group treated with 5% DE, and 8 in the group treated with 10% DE (see below). In addition, two 24-month-old untreated mice were used for primary cultures of VSMCs from the ascending aorta. Ten 6 month-old untreated C57BL6/J male mice were used as adult controls regarding the heart and body weights, blood pressure, histology and vascular mechanics. All animal housing and surgical procedures were in accordance with institutional guidelines.

### 2.2. Aqueous Extract of Dill and Treatment

The pure aqueous dill extract (DE) was prepared by mixing 5 g of dill seed powder with distilled water qs 100 g. The mixture was agitated overnight at 4 °C and then centrifuged for 15 min at 8000× *g* at 4 °C. The final product, i.e., DE, was obtained after four successive filtration steps (3, 1.2, 0.8, and 0.45 μm) [37].

A 3-month chronic treatment with two concentrations of DE (5% or 10% *v/v*) in drinking (tap) water was administered to the aged mice (21–22 months at the beginning of treatment, 24–25 months at the end of treatment). The DE-supplemented water was replaced every two days. Several successive batches of DE were used throughout the 3-month treatment period. Control mice were given tap water without DE.

### 2.3. Blood Pressure

Blood pressure was measured at the tail artery in awake animals by using a CODA tail-cuff recorder (Kent Scientific, Torrington, CT, USA). Measurements were repeated two times a day for the 3 last days of treatment. The values obtained on days 2 and 3 were averaged for each animal, as previously described [33].

### 2.4. Surgical and Post-Surgical Procedures

At the end of the *in vivo* study period and following the blood pressure measurements, all experimental and control mice were anesthetized using pentobarbital (60 mg/kg) for organ collection. The organs were then studied by using the following methods.

#### 2.4.1. Heart Weight

Hearts were collected, washed, and weighed (wet weight). Left ventricle, right ventricle, and septum were then dissected, washed, and separately weighed (wet weight). Total heart weight to body weight (HW/BW), left ventricle + septum weight to body weight (LV + S/BW), and right ventricle weight to body weight (RV/BW) ratios were calculated as percentages.

#### 2.4.2. Ascending Aorta Mechanics and Reactivity

The ascending aorta was excised and placed in a physiological buffer composed of 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.6 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.17 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.6 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5.5 mM D-glucose, 0.025 mM EDTA, 10 mM HEPES (pH 7.4). The vessels were then cannulated and mounted onto a pressure myograph placed under a video microscope, allowing for aorta bathing and filling with a physiological solution at 37 °C. A proprietary video analysis software system, WinDiam, coupled to the video microscope, was used to measure the inner and outer vessel diameters while changing the intraluminal pressure of the vessel, i.e., changing the pressure of the physiological buffer filling the vessel lumen from 0 to 175 mmHg. Below 125 mmHg, the inner diameter was calculated as described [12,40].

Distensibility, i.e., the change in relative luminal volume (percentage) per mmHg [41], was then calculated. Here, we have used the distensibility per 25-mmHg increment ( $D_{25}$ ). In the following, “distensibility” will mean  $D_{25}$ .

Circumferential midwall strain ( $\epsilon$ ), circumferential wall stress ( $\sigma$ ), and incremental elastic modulus ( $E_{inc}$ ) were calculated according to classical formulas [42].  $\epsilon$  is relative increase in diameter, at a given pressure, as compared to the diameter at no pressure.  $\sigma$  are the forces that are circumferentially applied on each small portion (surface) of the vessel wall.  $E_{inc}$  is indicative of wall stiffness.

Variations of the ascending aorta diameter in response to  $10^{-5}$  M phenylephrine (PE), a VSMC-dependent vasoconstrictor mainly acting through the  $\alpha_1$ -adrenoceptors, then  $10^{-5}$  M acetylcholine (ACh), an endothelial cell-dependent vasodilator, was assessed at 75 mmHg [12].

The detailed protocol is described in Appendix A.

#### 2.4.3. Histological Examination

The ascending aorta was excised and conserved in 4% PFA for one night at 4 °C and embedded in paraffin. Five-micrometer sections were cut, deparaffinized with xylene, hydrated in ethanol, and then rinsed with water. Weigert coloration (resorcin-fuschin) was used for the staining of elastic fibers. After staining, the ascending aorta cross-sections were examined under a light microscope (Nikon, France). The number of elastic lamellae and elastic lamellae disruptions were counted in high magnification images ( $40\times$  objective) from three animals per group. For these experiments, in 3 separate ascending aorta cross-sections from each animal, the numbers of elastic lamellae were counted in 8 distinct locations of the wall ( $\sim$  every 45°) and elastic lamellae disruptions were counted in the entire aorta wall. The counts of elastic lamellae and the ratio of lamellae disruptions to total lamellae were then averaged and compared between the groups.

#### 2.4.4. RNA Analyses

Total RNA was extracted from the thoracic descending aorta with the E.Z.N.A.<sup>®</sup> total RNA kit I (Omega Biotek, Inc., Norcross, GA, USA) and genomic DNA was digested with DNase I. Gene expression levels were evaluated by real-time PCR using a CFX96<sup>®</sup> real-time system with the IQ<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> Green supermix (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) after oligodT- primed reverse transcription of 200 ng of total RNA. Expression of tropoelastin (TE) and lysyl-oxidase like-1 (LOXL-1) mRNAs were normalized against total mRNA levels, quantified using the Quant-iT<sup>™</sup> Ribogreen<sup>®</sup> RNA assay kit (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Amplification primers for the tested gene were 5'-AAGCTGCTGCTAAGGCTGC-3' (antisense) and 5'-TGCAACTCCTCCACCTGGGAA-3' (sense) for tropoelastin, and 5'-CAGCTTCTGCCTGGAGGACA-3' (antisense) and 5'-CGTAGCGACCTGTGTAGTGGATG-3' (sense) for lysyl-oxidase like-1 [13,33].

#### 2.4.5. Elastin Production by Cultured VSMCs

##### Cell Culture

As previously described [36], vascular smooth muscle cells (VSMCs) were isolated from the ascending aortae of two 24-month-old mice by enzymatic digestion with collagenase type 2 (1 mg/mL) and elastase (0.5 mg/mL) for 40 min at 37 °C. The suspension was centrifuged at  $600\times g$  for 10 min, and the cells were collected and seeded in 2 wells from a 48-wells plate (cells from each ascending aorta in a separate well) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), containing 20% bovine fetal serum (FBS), 1% (*v/v*) penicillin/streptomycin solution and 1% non-essential amino acids solution (NEAA), and maintained in 5% CO<sub>2</sub> humidified air at 37 °C. After confluence, cells were isolated by trypsinization, cell culture was amplified and used at the 4th passage.

##### Extracellular Elastin Quantification

As previously described [36], VSMCs were cultured in 96-well plates in fresh 1% FBS-DMEM until they reach total confluency. They were then bathed in 1% FBS-DMEM supplemented with 0%,

1%, or 3% DE (*v/v*, final concentration). Because, in cell cultures, DE does not undergo the digestion process and the associated potential loss of potency (in contrast to the chronic DE treatment of mice), the DE concentrations used for cultured VSMC treatment were lower than those used in the chronic treatment of mice, in accordance with DE concentrations previously used in skin cell cultures [38]. The effects of the corticosteroid dexamethasone (0.1  $\mu\text{M}$ ) and the ATP-dependent potassium channel opener diazoxide (50  $\mu\text{M}$ ) were also tested as potential positive controls, with previously described stimulation of elastin expression by fibroblasts or VSMCs [32,34,36,43]. After 48 h, VSMCs were exposed to the primary antibody to elastin (ab21610, Abcam, Paris, France) before application of the secondary antibody coupled to horseradish peroxidase (HRP). This was followed by addition of the substrate of HRP, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), the reaction being stopped by the addition of sulfuric acid. The reaction end-product was then quantified by measuring its absorbance at 450 nm, which was calibrated to the elastin concentration in the well.

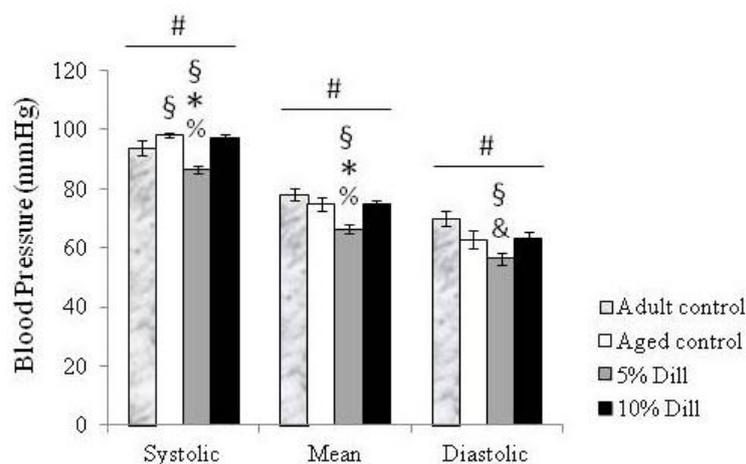
#### 2.4.6. Statistics

Comparisons were done using one- or two-way ANOVA followed when necessary by Fisher's least significant difference test (LSD) for paired value comparisons. Unless otherwise indicated, the results are presented as mean values  $\pm$  SEM, and *p*-values  $\leq 0.05$  were considered as statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1. Blood Pressure

Systolic blood pressure was lower in adult compared to aged untreated animals. Treatment with 5% DE induced a significant 11–12% decrease in systolic and mean blood pressures of aged animals, as compared to both untreated and 10% DE-treated aged mice. A similar strong trend was observed regarding diastolic blood pressure. Systolic, mean, and diastolic blood pressures were also significantly lower in 5% DE-treated aged mice compared to untreated adult animals. Treatment of aged mice with 10% DE did not significantly change blood pressure compared to untreated aged animals or untreated adult animals (Figure 1).



**Figure 1.** Systolic, mean, and diastolic arterial blood pressure in control (untreated) and DE-treated aged mice. Values are mean  $\pm$  SEM. Control: untreated animals. Dill: DE-treated animals. # Significant effect of treatment (one-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ). § Significant difference with untreated adult mice (LSD test following one-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ). \* Significant difference with untreated aged mice (LSD test following one-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ). % Significant difference with 10% DE-treated aged mice (LSD test following one-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ). & Strong trend towards a difference between 5% DE-treated mice and corresponding untreated adult mice as well as 10% DE-treated aged mice (LSD test following one-way ANOVA,  $p = 0.06$ ).  $n = 4\text{--}6$  in each group.

### 3.2. Body and Heart Weight Measurements

Body weight was not significantly changed by DE treatments nor by aging. Total heart weight-, left ventricle plus septum weight-, and right ventricle to body weight ratios (HW/BW, LV + S/BW and RV/BW, respectively) were measured in all groups of mice. Interestingly, the treatments with 5% DE and 10% DE completely reversed the age-dependent cardiac hypertrophy observed in untreated animals by inducing HW/BW and LV + S/BW ratio decreases in the range of 15% in treated aged animals. RV/BW ratios seemed to be unaffected by age and treatment (Table 1).

**Table 1.** Body weight (BW) and ratios of total heart weight (HW/BW), left ventricle plus septum weight (LV + S/BW), and right ventricle (RV/BW) to BW in untreated adult mice as well as untreated and DE-treated (5% or 10% *v/v*) aged male mice.

	Adult	Aged		
		0% Dill	5% Dill	10% Dill
Body weight (g)	32.4 ± 1.5	30.4 ± 0.8	31.7 ± 0.8	32.5 ± 1
HW/BW	0.48 ± 0.01	0.56 ± 0.03 *	0.47 ± 0.003 &	0.48 ± 0.03 &
LV+S /BW	0.37 ± 0.006	0.43 ± 0.009 *	0.36 ± 0.005 &	0.37 ± 0.02&
RV/BW	0.1 ± 0.004	0.12 ± 0.006	0.1 ± 0.002	0.1 ± 0.007

Data are mean ± SEM. n = 3–5 per group. Dill: DE. \* Significant difference with the corresponding value in adult untreated mice (one-way ANOVA, followed by LSD test,  $p \leq 0.05$ ). & Significant difference between DE-treated and untreated aged mice (one-way ANOVA followed by LSD test,  $p \leq 0.05$ ).

### 3.3. Ascending Aorta Morphology

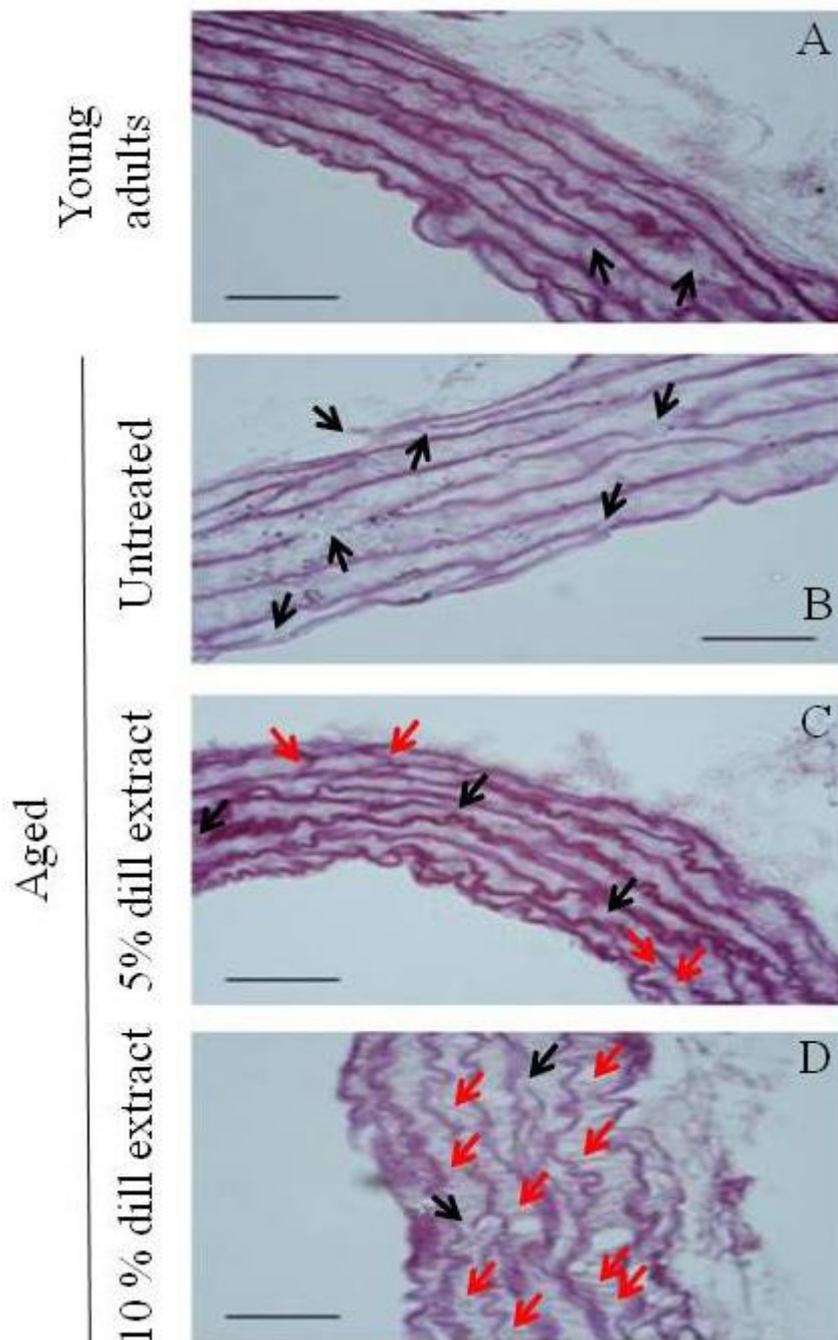
Weigert staining showed that, compared to untreated adult and aged mice (Figure 2A,B), additional neo-synthesized elastic fibers of various orientations were observed in the ascending aorta wall of DE-treated aged mice. This was particularly evident in 10% DE-treated mice, in which many of these neo-elastic fibers were present, some of them being radially-oriented, i.e., bridging the pre-existing elastic lamellae (Figure 2C,D).

As compared to untreated adult animals, the aortic elastic lamellae (EL) of untreated aged animals appeared considerably fragmented, while treatment of aged animals with DE resulted in more continuous EL, with significantly less fragmentations compared to untreated controls. A trend towards less disruptions at 10% DE compared to 5% DE was also observed. The number of disruptions of each elastic lamella of aged mice was reduced by 23% after 5% DE treatment and by 33% after 10% DE treatment. The number of EL in the media of the ascending aorta was not significantly affected by age or treatment (Table 2).

**Table 2.** Histomorphometric analysis of the elastic lamellae in the ascending aorta wall.

	Adult	Aged		
		0% Dill	5% Dill	10% Dill
Number of elastic lamellae (EL)	6.81 ± 0.31	7.12 ± 0.36	7.58 ± 0.25	7.66 ± 0.33
Number of disruptions per EL	2.49 ± 0.11	5.93 ± 0.49 *	4.58 ± 0.2 *&	3.99 ± 0.46 *&

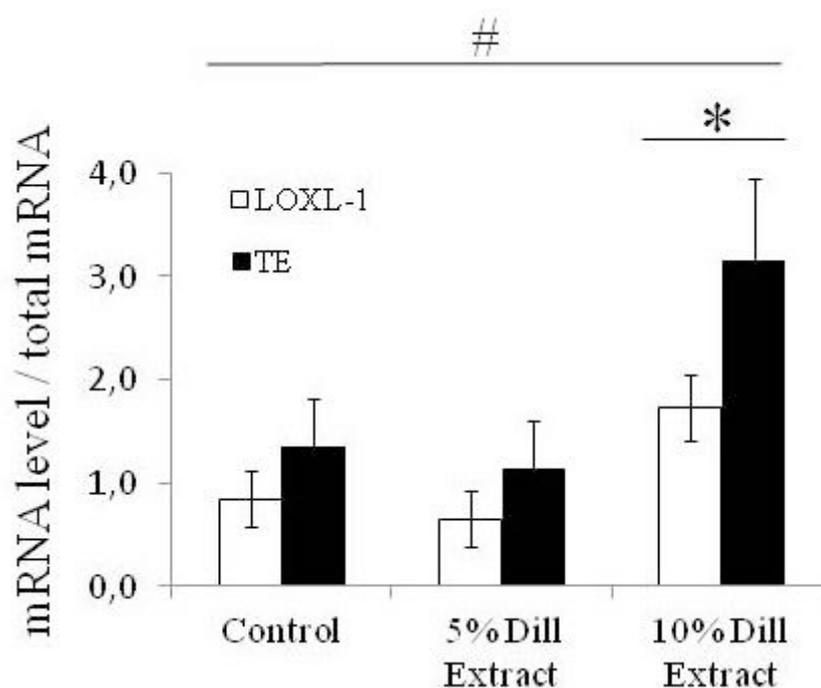
Data are mean ± SEM. Three animals per group were used. Dill: DE. \* Significant difference with the corresponding value in adult untreated mice (one-way ANOVA, followed by LSD test,  $p \leq 0.05$ ). & Significant difference between DE-treated and untreated aged mice (one-way ANOVA followed by LSD test,  $p \leq 0.05$ ).



**Figure 2.** Histology of the ascending aorta from (A) untreated adult mice, (B) untreated aged mice, (C) 5% DE-treated aged mice, (D) 10% DE-treated aged mice. Cross-sections with Weigert staining of the elastic fibers. Bar = 50  $\mu$ m. Black arrows: elastic lamella disruptions. Red arrows: neo-synthesized elastic fibers. n = 3 animals per group.

#### 3.4. Tropoelastin and Lysyl-Oxidase Like-1 mRNA Levels

Tropoelastin (TE) and lysyl-oxidase-like-1 (LOXL-1) gene expressions were quantified by measurement of the mRNA levels. Chronic treatment with DE had a general significant effect on TE and LOXL-1 gene expressions. Treatment with 10% DE, not 5% DE, produced a substantial elevation of both TE and LOXL-1 mRNA levels, in the range of a doubling, compared to controls (Figure 3).



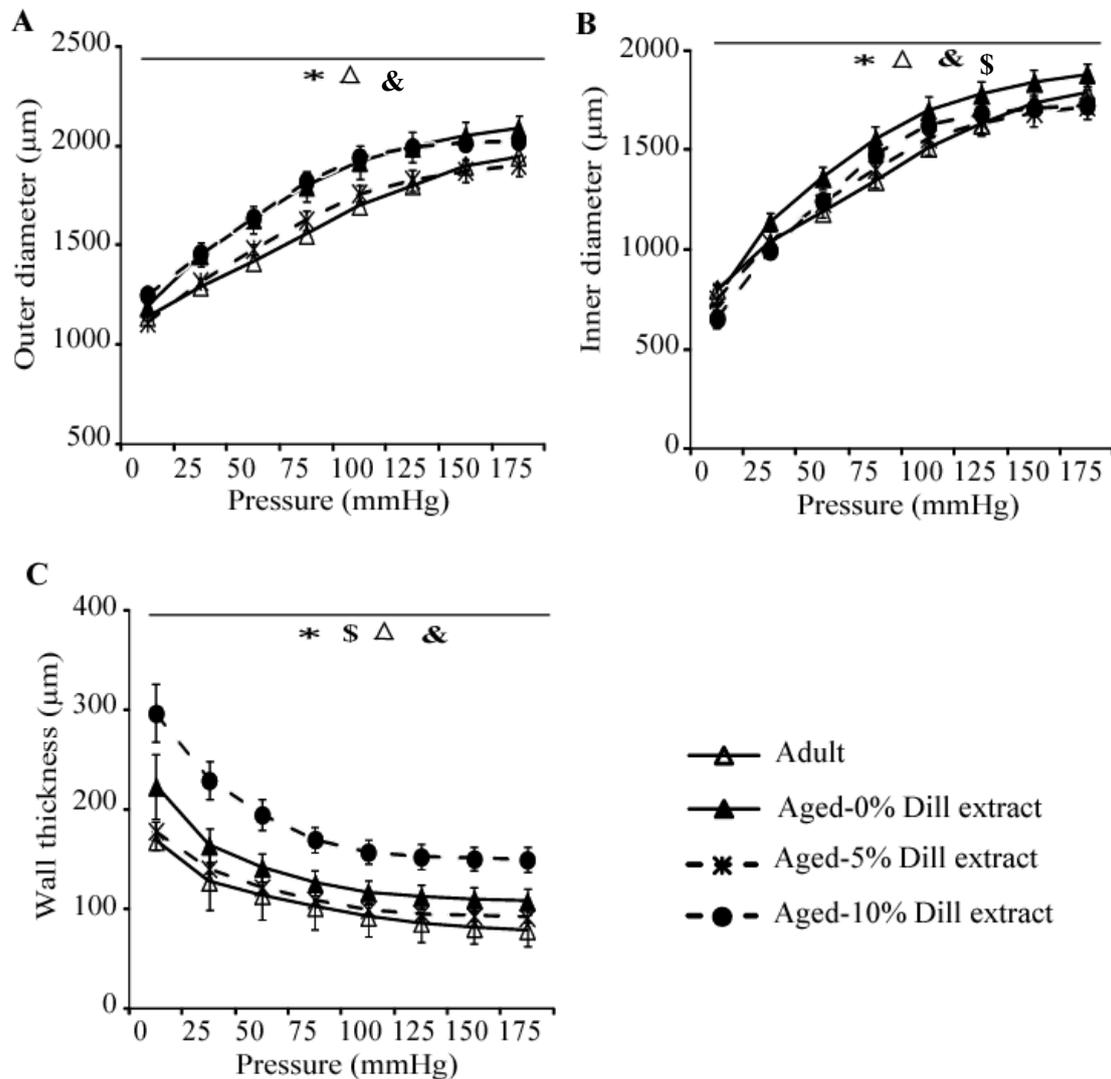
**Figure 3.** Tropoelastin (TE) and lysyl-oxidase-like-1 (LOXL-1) mRNA levels after DE treatments of aged mice. # Significant effect of treatment (two-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ). \* Significant difference between 10% DE-treated mice and corresponding untreated (control) 24-month-old mice (LSD test following two-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ).  $n = 3$ – $7$  in each group.

### 3.5. Biomechanical Properties of the Ascending Aorta

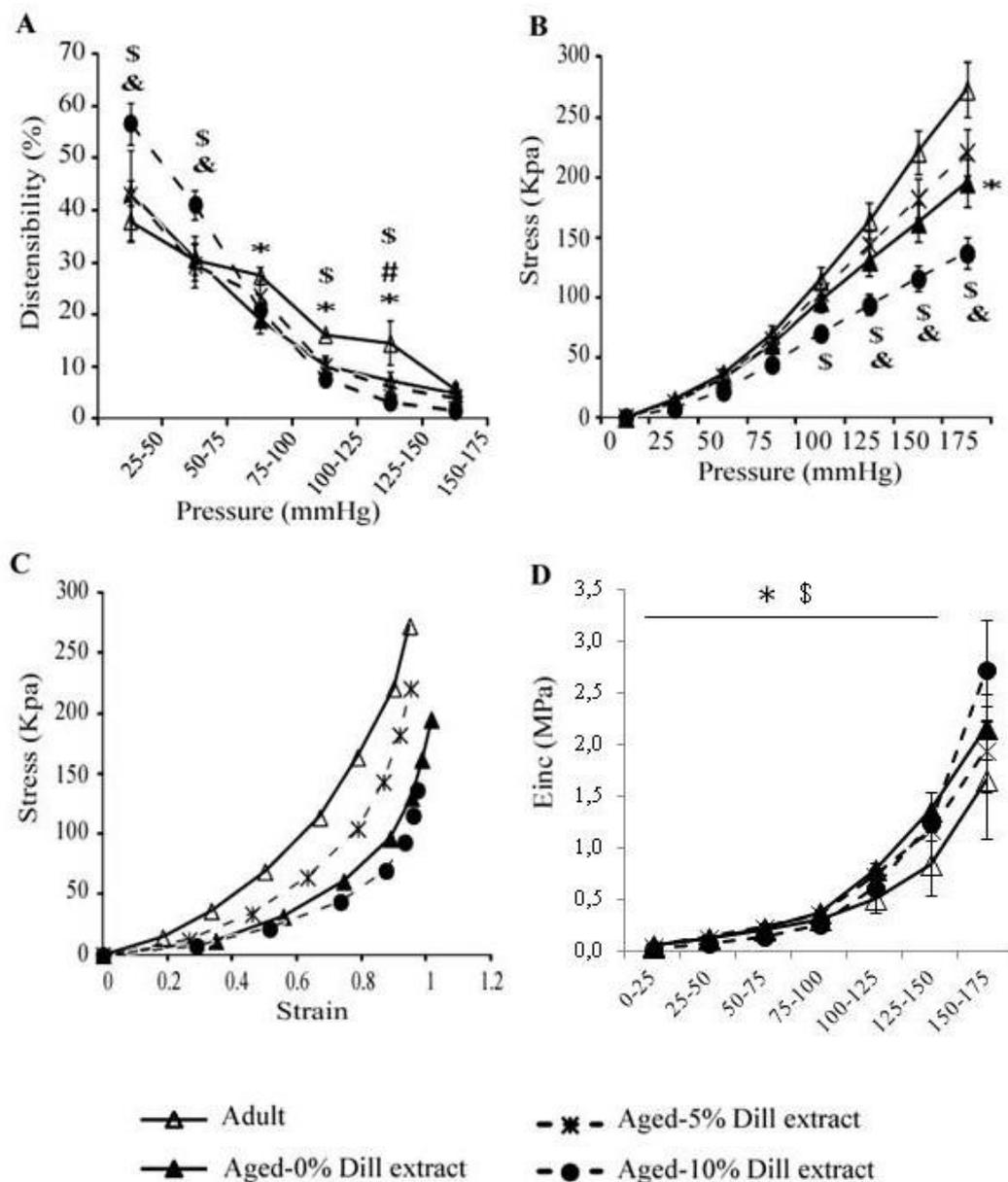
Ex-vivo biomechanical studies of the ascending aorta exhibited a general age-dependent increase in arterial outer diameter (OD), inner diameter (ID), and wall thickness (Figure 4A–C). Treatment with 5% DE induced a reduction of OD, ID, and wall thickness, compared to those of untreated aged mice. Therefore, the dimensions of 5% DE-treated arteries of aged animals returned closer to those of the untreated adult animals (Figure 4A–C). It was also observed that 10% DE treatment of aged mice induced a thickening of the arterial wall (Figure 4C), leading in particular to a reduced ID compared to age-matched untreated animals (Figure 4B).

Regarding the mechanical parameters, a general age-dependent decline in distensibility was observed in the 75–150 mmHg pressure range (Figure 5A). No significant improvement of the aortic distensibility was observed in aged mice after 5% DE treatment (Figure 5A). However, aortae from 10% DE-treated aged animals presented an increased distensibility at low pressure (25–75 mmHg, covering in part the physiological pressure range), compared to adult and aged untreated animals (Figure 5A). Circumferential wall stress, inversely proportional to wall thickness, was found lower at high pressure in untreated aged animals compared to corresponding untreated adult mice. After 10% DE treatment of aged animals, circumferential stress was also found significantly lower in the 125–175 and 100–175 mmHg pressure ranges, when compared to untreated young and aged animals, respectively (Figure 5B). The aorta stress-strain curve from 5% DE-treated mice was between those from untreated adult and aged animals. At similar circumferential strain, the arterial wall stress values of 10% DE-treated aged mice were lower than that of adult and, to a lower extent, aged untreated animals (Figure 5C). Incremental elastic modulus (Einc), indicative of the wall material stiffness, was increased by aging in the untreated groups, as expected. Interestingly, when compared in the 0–150 mmHg range, the aorta Einc was significantly decreased in 10% DE-treated aged mice. In this group, Einc values were lower than those from age-matched untreated animals and close to those from untreated adult mice. In the 150–175 mmHg range, no significant differences between groups could be observed, possibly

because of the higher variability of Einc and markedly increased aortic Einc in 10% DE-treated mice, reaching their maximal strain in this range (compensating their higher distension at lower pressures) (Figure 4A,B and Figure 5D).



**Figure 4.** Diameter-pressure curves and wall thickness of the ascending aorta of untreated, 5% DE- or 10% DE-treated aged mice, as well as untreated (control) adult animals. (A) Outer diameter-pressure relation; (B) inner diameter-pressure relation; (C) wall thickness-pressure relation. \* General significant difference between untreated adult and untreated aged mice (two-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ). & General significant difference between 10% DE-treated aged mice and untreated adult mice (two-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ). \$ General significant difference between 10% DE-treated and untreated aged mice (two-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ). Δ General significant difference between 5% DE-treated and untreated aged mice (two-way ANOVA,  $p \leq 0.05$ ).  $n = 4-7$  per group.

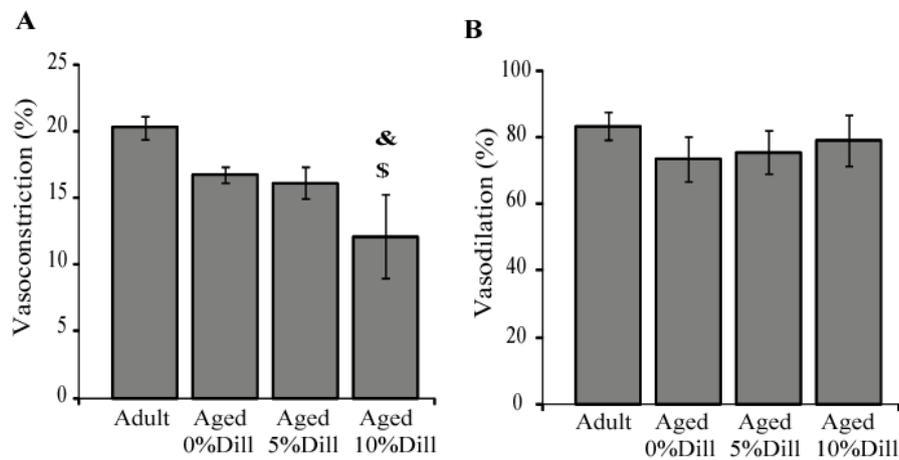


**Figure 5.** Mechanical parameters of the ascending aorta of untreated 5% DE- or 10% DE-treated aged mice, as well as untreated (control) adult animals. (A) Aortic distensibility-pressure increment relation; (B) circumferential stress-pressure relation; (C) stress-strain relation; (D) incremental elastic modulus (Einc)-pressure increment relation. \* Significant difference between untreated adult and untreated aged mice (two-way ANOVA followed by LSD test if necessary,  $p \leq 0.05$ ). & Significant difference between 10% DE-treated aged mice and untreated adult mice (two-way ANOVA followed by LSD test if necessary,  $p \leq 0.05$ ). \$ Significant difference between 10% DE-treated aged mice and untreated aged mice (two-way ANOVA followed by LSD test if necessary,  $p \leq 0.05$ ). # Significant difference between 5% DE-treated mice and adult control mice (two-way ANOVA followed by LSD test if necessary,  $p \leq 0.05$ ). n = 4–7 per group.

### 3.6. Ex Vivo Response of Ascending Aorta Segments to Vasoactive Agents

A strong trend towards an age-dependent decrease in the phenylephrine (PE)-induced vasoconstriction was observed in untreated animals: the aortic diameter decrease was of 17% in aged mice compared to 20% in adult animals (one-way ANOVA,  $p = 0.06$ ; Figure 6A). Interestingly, when compared with adult and aged controls, chronic treatment with 10% DE, not 5% DE, reduced

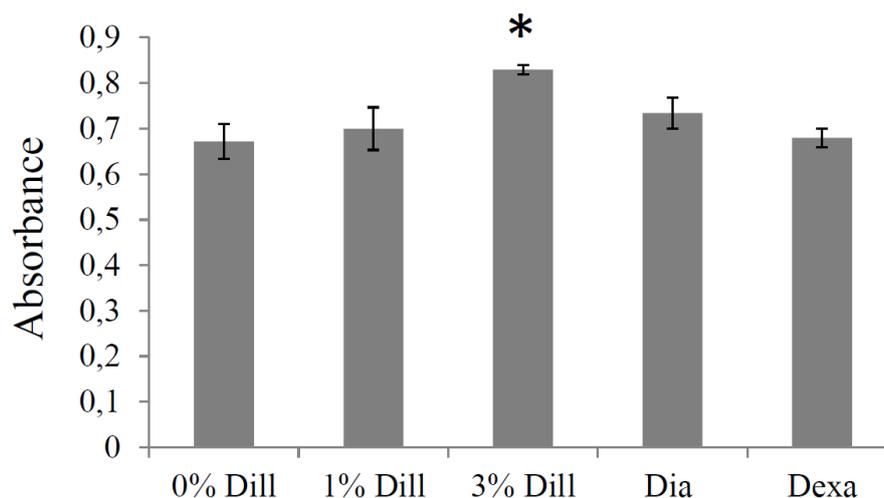
the vascular response to phenylephrine (Figure 6A). Regarding the response to acetylcholine (Ach), no significant difference between groups could be detected (Figure 6B).



**Figure 6.** Influence of 5% and 10% DE treatment on the ascending aorta reactivity in aged mice, compared to adult or aged untreated animals. (A) Response to the vasoconstrictor phenylephrine ( $10^{-5}$  M) on the arterial inner diameter; (B) response to the vasodilator acetylcholine ( $10^{-5}$  M) on the restoration of the inner diameter of the aorta pre-constricted with  $10^{-5}$  M phenylephrine. Dill: DE. & Significant difference between 10% DE-treated aged mice and untreated adult (control) mice (one-way ANOVA followed by LSD tests,  $p \leq 0.05$ ). \$ Significant difference between 10% DE-treated aged mice and untreated aged (control) mice (one-way ANOVA followed by LSD test,  $p \leq 0.05$ ).  $n = 4-7$  per group.

### 3.7. Impact of DE on Elastin Production by Cultured VSMCs

Acute treatment with 3% DE induced a significant increase in elastin synthesis (+24%) in cultured VSMCs from mouse ascending aortae. The 1% DE treatment, as well as dexamethasone and diazoxide at the concentrations tested [36,43], did not trigger a significant augmentation of elastin synthesis, although diazoxide produced a trend towards elevation (+10%; Figure 7).



**Figure 7.** Effect of DE on elastin production by cultured vascular smooth muscle cells from the ascending aorta of aged mice. The effects of dexamethasone (Dexa,  $0.1 \mu\text{M}$ ) and diazoxide (Dia,  $50 \mu\text{M}$ ) were also tested as these compounds have previously been shown to result in elastin production stimulation by cultured aortic VSMCs (see text). Dill: DE. The absorbance is representative of extracellular elastin quantity. \* Significantly different from 0% DE, the negative control (one-way ANOVA, followed by LSD tests,  $p \leq 0.05$ ).  $n = 5-6$  in each group.

#### 4. Discussion

Identification of new therapeutic strategies to qualitatively and/or quantitatively improve the arterial wall elastic fibers could have major importance to counteract the age-associated alterations of blood vessel structure and function, and the cardiovascular system. In arteries or VSMC cultures from developing, adult, or aged rats or mice, several pharmacological treatments have shown promise to induce elastic fiber neosynthesis and/or elastin LOX or LOXL-1 expressions. However, several of those identified thus far, including the ATP-sensitive potassium channel openers and derivatives like minoxidil [4,29–36], have secondary effects such as edema and/or cardiac hypertrophy [4,31,33,36,44,45] that limit their usefulness. It was, therefore, important to continue the search for treatments devoid of such negative side effects. DE treatment has been shown, *in vitro*, to increase LOXL-1 gene expression in skin fibroblast and elastin production in dermal equivalent models [38], as well as to improve skin elasticity and smooth age-related face wrinkles in women [37]. In the present study, we have shown that a 3-month treatment of aged male mice with DE reduces the aortic elastic lamella disruptions induced by ageing (5% and 10% DE), leads to elastic fiber neosynthesis and functional improvement of the ascending aorta (10% DE), and reverses the age-related cardiac hypertrophy.

Most striking was the substantial protection of aortic elastic lamella integrity in aged mice produced by DE, with reductions by 23–33% of the number of elastic lamella disruptions observed after DE treatment. While the mechanism underlying this protective effect remains unclear, it may be related to the polyphenols, e.g., tannins and flavonoids that are present in dill seeds [46,47]. Polyphenols have previously been shown to have beneficial effects on the cardiovascular system through their antioxidant activity [48–51]. Additionally, polyphenols have been shown to dose-dependently reduce the activity of elastin-degrading enzymes belonging to the serine proteinase, cysteine proteinase, and metallo-proteinase families [52,53]. Finally, polyphenols have been shown to reverse age-related calcification of elastic fibers through inhibition of the activity of alkaline phosphatase [54,55].

Our results also indicated that 10% DE treatment increases the expressions of both tropoelastin and LOXL-1, two major contributors to elastic fiber synthesis and assembly in the aorta of aged mice. Additionally, we demonstrated that DE elevates the production of elastin by cultured VSMCs from the ascending aorta. Somewhat surprisingly, two previously demonstrated stimulators of elastin production by aortic VSMCs, dexamethasone and diazoxide [32,34,36] appeared less active in stimulating elastin biosynthesis in the ascending aortic VSMCs used in the present experiments, compared to that shown previously in cultured VSMCs from the entire aorta [32,34,36]. Here, the relative lack of VSMC responsiveness to these two molecules might be due to the differences in the developmental origin of the ascending aorta, used in the present experiments, and the aortic arch, in which the VSMCs arise from the neural crest, and the remainder of the aorta whose VSMCs arise from the mesoderm [56–59]. Supporting this hypothesis, aorta from these two different developmental origins have been shown to differentially respond to a variety of other activators. In embryos, compared to VSMCs from the descending aorta, VSMCs from the ascending aorta or the aortic arch present substantially elevated  $\alpha 1$  (I) procollagen, *c-myb*, integrin  $\beta 8$ , and mesothelin mRNA levels in response to TGF- $\beta 1$  stimulation and contract less in response to the vasoconstrictors KCl (at high concentration) and phenylephrine. Also, in adult mice, the ascending aorta constricts significantly more than the descending aorta in response to endothelin-1 [60,61].

We also observed numerous additional neo-synthesized elastic fibers of various orientations, particularly in radial fibers bridging adjacent elastic lamellae, in the aortic wall after DE treatment, particularly in 10% DE-treated aged mice, with no change in the number of elastic lamellae. Similarly, these same multiple orientations of neo-elastic fibers were observed after minoxidil treatment [33,36]. Notably, 10% DE treatment led to aortic wall thickening and subsequent decreased wall stress in aged mice, while 5% DE decreased aortic wall thickness, which tended to increase stress and return the stress–strain relation (i.e., circumferential forces applied within the wall to the cells and ECM at a given strain) closer to that in adult animals. The remodeling induced by 10% DE, not 5% DE, was accompanied by a significant increase in aortic distensibility and reduction of arterial stiffness in

the physiological blood pressure range. The improved mechanical function of the aorta following 10% DE treatment of aged mice likely contributes to improved hemodynamics. This is of importance since aortic distensibility normally decreases with age, due to elastic fiber degradation, and is correlated with various cardiovascular diseases such as atherosclerosis, myocardial infarction, and high blood pressure [62,63]. Here, the improvement of arterial elasticity in the physiological pressure range by 10% DE could explain the observed reversal of the classical age-related cardiac hypertrophy, since LV mass is inversely correlated with aortic distensibility [64]. The decrease in the  $\alpha$ -adrenergic-induced vasoconstriction induced by 10% DE treatment could also contribute to the reversal of age-related cardiac hypertrophy. In contrast, the reduction of blood pressure by 5% DE could account for a decrease in cardiac workload and explain the reversal of the age-related cardiac hypertrophy observed at this DE concentration. A possible role of the phenolic compounds present in dill seeds could also partly explain this effect of DE since treatment with the polyphenol resveratrol has been shown to prevent LV hypertrophy in obese mice [65]. The reversal of age-related cardiac hypertrophy by 5% and 10% DE treatments is a potentially important improvement compared to some previously characterized treatments that induce elastic fiber neo-synthesis such as minoxidil, which, in contrast to the effect of DE, result in increased heart weight and/or dimension in adult or aged animals [31,33,36]. It should be noted that DE-induced reversal of age-related cardiac hypertrophy without any significant impact on the body weight is essentially due to the reversal of the age-dependent hypertrophy of the left ventricle. The right ventricle weight was not impacted by ageing, and DE treatment maintained (i.e., did not decrease) its mass in aged animals. This again is an improvement compared to minoxidil, which elevates both the left and right ventricle masses in aged animals [33,36].

As noted above, an interesting aspect of the study related to the observation of some different responses of the ascending aorta to the 5% DE and 10% DE treatments. Many of the differences—with an effect of DE of higher amplitude or only observed with 10% compared to the 5% concentration—could simply be explained by a classical dose-response effect of DE on the VSMCs. This is the case for the effect of DE on elastin integrity (disruptions), the increase in TE and LOXL-1 mRNA levels, the neosynthesis of elastic fibers, the augmentation of the aorta wall thickness and related reduction of wall stress, the increased distensibility and decreased stiffness, and the responsiveness to phenylephrine. However, explanations for the observed effects induced by the lower concentration of DE, but not the higher concentration or opposite effects of the two concentrations, are less obvious. This is the case regarding the blood pressure reduction induced by 5% DE only, but not 10%, and the aortic wall thinning and subsequent trend towards increased stress induced by 5% DE (wall stress is inversely proportional to thickness), while 10% DE led to increased wall thickening and decreased stress. The wall thickness decrease in response to 5% DE could be explained by the reduction in blood pressure induced by 5% DE since it has long been established that long term blood pressure reduction and off-loading of the arterial wall leads to wall involution, i.e., atrophic wall remodeling, and decreased wall thickness [66,67]. However, the explanation for the finding that blood pressure is reduced in response to 5% DE, but not 10% DE, remains unclear. This could represent a differential effect of DE concentrations on the major cell types present in the aortic wall. A higher impact of 5% DE on endothelial cells, for example, could lead to an augmented production of NO, a major vasodilator, and decreased blood pressure. By contrast, higher DE concentrations, i.e., 10% DE, could result in differential stimulation of VSMCs, leading to increased vasoconstriction. Such a biphasic response involving endothelial cells at low dose and VSMCs at higher doses was also observed in the contractile responses of the aorta or coronary artery to acetylcholine and mesenteric artery to endothelin-3 [68–70]. Irrespective of this difference, however, both 5% and 10% DE resulted in elastic fiber preservation and neosynthesis, as well as functional improvements that led to reversal of the age-related left ventricular hypertrophy.

## 5. Conclusions

In conclusion, our results show that DE treatment of aged mice protects pre-existing elastic lamellae, reactivates tropoelastin and LOXL-1 expressions, induces elastic fiber neo-synthesis, and decreases

the stiffness of the aging aortic wall, and results in reversal of the age-related cardiac hypertrophy. These findings strongly suggest that DE treatment improves cardiovascular function in aged animals. From this perspective, DE could be an important new anti-aging product for the cardiovascular system, which could be readily assessed in human clinical trials aimed at the prevention or treatment of age-related vascular stiffness and its sequelae. Identification of the active compound(s) present in DE and further pre-clinical experiments to determine optimal conditions leading to improved aortic elasticity and improvement of the orientations of the neo-elastic fibers generated by DE treatment, i.e., increasing the proportion of circumferentially-oriented neo-elastic fibers, would be beneficial. Studies evaluating the start of the treatment earlier in life (at 16–18 months of age) and/or an extension of the treatment duration could also be beneficial.

**Author Contributions:** Conceptualization, W.F., N.K., V.C., P.S., W.A.B., M.-P.J. and G.F.; methodology, W.F., P.S., M.-P.J. and G.F.; software, W.A.B. and G.F.; investigation, W.F., Q.B., M.-P.J. and G.F.; writing—original draft preparation, W.F., P.S., M.-P.J. and G.F.; writing—review and editing, W.F., Q.B., V.C., P.S., W.A.B., M.-P.J. and G.F.; supervision, G.F.; project administration, G.F.; funding acquisition, P.S. and G.F.. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by association Autour des Williams (France), the European Commission (grants TELASTAR, 5th PCRD, No. QLK6-CT-2001-00332 and ELAST-AGE, 6<sup>th</sup> PCRD, No. LSHM-CT-2005-018960), the Agence Nationale de la Recherche (ANR, France, grant Arterylastic: ANR-18-CE18-0001) and the Région Rhône-Alpes, France.

**Acknowledgments:** The authors thank Brigitte Gonthier, Sophie Bouyon and Sandrine Brasseur for technical assistance.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Appendix A

### *Surgical Procedure and Mechanical Studies*

Animals were anaesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital (60 mg/kg), and an injection of heparin (90 units/30 g) was performed in the saphenous vein. The ascending aorta was quickly excised and placed in a physiological buffer (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.17 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.6 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.6 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 5.5 mM D-glucose, 0.025 mM EDTA, 10 mM HEPES; pH = 7.4). The vessels were cleaned of adhering connective tissue and fat, then cannulated and mounted onto a pressure arteriograph, as described previously [13,40]. The pressure arteriograph was composed of a plexiglass organ bath (filled with 10 mL physiological buffer), surrounded by a water jacket for heat regulation, in which two aligned cannulas (diameter: ~1 mm) are supported by holders. Each cannula was ligatured to one end of the ascending aorta, while the opposite end of the cannula was connected to a small tube joining a reservoir filled with physiological buffer, also allowing for changes of the pressure in the tubing and vessel. Verification of the absence of physiological buffer leakage (because of a wrong ligation or presence of a small hole in the vessel) upon pressurization of the vessel is then performed prior to starting the experiments. The experiments were performed at 37 °C and the physiological buffer present in the bath and in the vessel was replaced every 15 min. Following a 30-min equilibration period, the vessel was trans-illuminated under an inverted microscope connected to a charged-coupled device camera and to a computer. The proprietary software Windiam allowed for the continuous detection of the vessel inner and outer borders on the images from the camera (2 images/s) and recording of the vessel diameters [13]. Recordings of vessel inner diameters (IDs) and outer diameters (ODs) were taken while increasing the intravascular (transmural) pressure from 0 to 175 mmHg by steps of 25 mmHg (5 min per step). The inner diameter was directly measurable by transillumination above 125 mmHg, because of the thinning of the vessel wall due to increasing pressure-induced dilatation, allowing a clear and contrasted image of the inner wall edge. At lower pressures, as previously described, inner diameter can be accurately calculated through the entire range of pressure tested, from the measured OD and a unique measurement of vessel wall cross-sectional area (WCSA). As previously

described [12,40], assuming that WCSA is constant, the formula finally used to calculate ID was:  
 $ID_{x \text{ mmHg}} = \sqrt{(OD_{x \text{ mmHg}}^2 - OD_{175 \text{ mmHg}}^2 + ID_{175 \text{ mmHg}}^2)}$

Distensibility is defined as the change in relative volume (percentage) of the lumen per pressure unit during a change in intravascular pressure, as described by Smith and Kampine [41].

$$\text{Distensibility (D), in percent, is: } D = 100(\Delta V/V_A)/\Delta P \quad (\text{A1})$$

$V_A$  is the luminal initial volume before a small change in pressure.  $\Delta V$  is the luminal volume change ( $V_A$  to  $V_B$ ) in response to a change in transmural pressure (from pressure A to B). The luminal volume of a given constant length (L) of a vessel segment is  $L \cdot \pi \cdot ID^2/4$ , so that:

$$D = 100([L \pi \Delta(ID_B^2/4)]/[L \pi ID_A^2/4])/\Delta P \quad (\text{A2})$$

$$D = 100(\Delta(ID_B^2)/ID_A^2)/\Delta P = 100[(ID_B^2 - ID_A^2)/ID_A^2]/\Delta P \quad (\text{A3})$$

Since the pressure change increment in our experiments was 25mmHg, we replaced, in the following sections, the distensibility (% change in volume per 1mmHg) by the distensibility per 25mmHg increment ( $D_{25}$ ). In any pressure range, a 25mmHg pressure change between pressure X mmHg and pressure X + 25 mmHg leads to the following expression of  $D_{25}$ .

$$D_{25} = 100(ID_{X+25}^2 - ID_X^2) / ID_X^2 \quad (\text{A4})$$

Because the pressure-change increment in our experiments was 25mmHg, distensibility is expressed as the distensibility per 25mmHg increment ( $D_{25}$ ).

Circumferential midwall strain and circumferential wall stress were calculated according to the formulas given by Gibbons and Shadwick [42]:

Circumferential mid-wall strain ( $\epsilon$ ):  $\epsilon = \Delta R/R_0 = (R - R_0)/R_0$

Where R is the mid-wall radius ( $R = (OD + ID)/4$ ) and  $R_0$  is the mid-wall radius at no transmural pressure (0mmHg).

Circumferential wall stress ( $\sigma$ ):  $\sigma = P r/h$

Where P is the pressure (in kPa), r is the luminal radius (=ID/2) and h is the wall thickness.

1 kPa is assumed to be equal to 7.5006mmHg.

$\sigma$  represents the forces that are circumferentially applied on a each small portion (surface) of the vessel wall, because of the intraluminal pressure-induced stretching of the vessel.

Incremental elastic modulus ( $E_{inc}$ ):  $E_{inc} = 0.75 (1+\epsilon) \Delta\sigma/\Delta\epsilon$

$E_{inc}$  is a measure of the wall stiffness. 1 kPa is assumed to be equal to 7.5006mmHg.

$E_{inc}$  represents the arterial wall stiffness.

## References

- Zou, Y.; Zhang, Y. An experimental and theoretical study on the anisotropy of elastin network. *Ann. Biomed. Eng.* **2009**, *37*, 1572–1583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Baldwin, A.K.; Simpson, A.; Steer, R.; Cain, S.A.; Kielty, C.M. Elastic fibres in health and disease. *Expert Rev. Mol. Med.* **2013**, *15*, e8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fhayli, W.; Ghandour, Z.; Mariko, B.; Pezet, M.; Fauray, G. Elastin and microfibrils in vascular development and ageing: Complementary or opposite roles? *Biol. Aujourd'hui* **2012**, *206*, 87–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fhayli, W.; Boëté, Q.; Harki, O.; Briançon-Marjollet, A.; Jacob, M.-P.; Fauray, G. Rise and fall of elastic fibers from development to aging. Consequences on arterial structure-function and therapeutical perspectives. *Matrix Biol.* **2019**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Dobrin, P.B. Mechanical properties of arteries. *Physiol. Rev.* **1978**, *58*, 397–460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mariko, B.; Pezet, M.; Escoubet, B.; Bouillot, S.; Andrieu, J.-P.; Starcher, B.; Quagliano, D.; Jacob, M.-P.; Huber, P.; Ramirez, F.; et al. Fibrillin-1 genetic deficiency leads to pathological ageing of arteries in mice. *J. Pathol.* **2011**, *224*, 33–44. [[CrossRef](#)]

7. Barodka, V.M.; Joshi, B.L.; Berkowitz, D.E.; Hogue, C.W.; Nyhan, D. Review article: Implications of vascular aging. *Anesth. Analg.* **2011**, *112*, 1048–1060. [[CrossRef](#)]
8. Wagenseil, J.E.; Mecham, R.P. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol. Rev.* **2009**, *89*, 957–989. [[CrossRef](#)]
9. Laurent, S.; Cockcroft, J.; Van Bortel, L.; Boutouyrie, P.; Giannattasio, C.; Hayoz, D.; Pannier, B.; Vlachopoulos, C.; Wilkinson, I.; Struijker-Boudier, H.; et al. Expert consensus document on arterial stiffness: Methodological issues and clinical applications. *Eur. Heart J.* **2006**, *27*, 2588–2605. [[CrossRef](#)]
10. Li, D.Y.; Brooke, B.; Davis, E.C.; Mecham, R.P.; Sorensen, L.K.; Boak, B.B.; Eichwald, E.; Keating, M.T. Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. *Nature* **1998**, *393*, 276–280. [[CrossRef](#)]
11. Li, D.Y.; Faury, G.; Taylor, D.G.; Davis, E.C.; Boyle, W.A.; Mecham, R.P.; Stenzel, P.; Boak, B.; Keating, M.T. Novel arterial pathology in mice and humans hemizygous for elastin. *J. Clin. Investig.* **1998**, *102*, 1783–1787. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Faury, G.; Pezet, M.; Knutsen, R.H.; Boyle, W.A.; Heximer, S.P.; McLean, S.E.; Minkes, R.K.; Blumer, K.J.; Kovacs, A.; Kelly, D.P.; et al. Developmental adaptation of the mouse cardiovascular system to elastin haploinsufficiency. *J. Clin. Investig.* **2003**, *112*, 1419–1428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Pezet, M.; Jacob, M.-P.; Escoubet, B.; Gheduzzi, D.; Tillet, E.; Perret, P.; Huber, P.; Quaglino, D.; Vranckx, R.; Li, D.Y.; et al. Elastin haploinsufficiency induces alternative aging processes in the aorta. *Rejuvenation Res.* **2008**, *11*, 97–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Johnson, D.J.; Robson, P.; Hew, Y.; Keeley, F.W. Decreased elastin synthesis in normal development and in long-term aortic organ and cell cultures is related to rapid and selective destabilization of mRNA for elastin. *Circ. Res.* **1995**, *77*, 1107–1113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Pasquali-Ronchetti, I.; Baccarani-Contri, M. Elastic fiber during development and aging. *Microsc. Res. Tech.* **1997**, *38*, 428–435. [[CrossRef](#)]
16. Liu, X.; Zhao, Y.; Gao, J.; Pawlyk, B.; Starcher, B.; Spencer, J.A.; Yanagisawa, H.; Zuo, J.; Li, T. Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat. Genet.* **2004**, *36*, 178–182. [[CrossRef](#)]
17. Hornstra, I.K.; Birge, S.; Starcher, B.; Bailey, A.J.; Mecham, R.P.; Shapiro, S.D. Lysyl oxidase is required for vascular and diaphragmatic development in mice. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 14387–14393. [[CrossRef](#)]
18. Noblesse, E.; Cenizo, V.; Bouez, C.; Borel, A.; Gleyzal, C.; Peyrol, S.; Jacob, M.-P.; Sommer, P.; Damour, O. Lysyl oxidase-like and lysyl oxidase are present in the dermis and epidermis of a skin equivalent and in human skin and are associated to elastic fibers. *J. Invest. Dermatol.* **2004**, *122*, 621–630. [[CrossRef](#)]
19. Thorin-Trescases, N.; Thorin, E. Lifelong Cyclic Mechanical Strain Promotes Large Elastic Artery Stiffening: Increased Pulse Pressure and Old Age-Related Organ Failure. *Can. J. Cardiol.* **2016**, *32*, 624–633. [[CrossRef](#)]
20. McNulty, M.; Spiers, P.; McGovern, E.; Feely, J. Aging is associated with increased matrix metalloproteinase-2 activity in the human aorta. *Am. J. Hypertens.* **2005**, *18*, 504–509. [[CrossRef](#)]
21. Jacob, M.P. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed. Pharmacother.* **2003**, *57*, 195–202. [[CrossRef](#)]
22. Duca, L.; Blaise, S.; Romier, B.; Laffargue, M.; Gayral, S.; El Btaouri, H.; Kawecki, C.; Guillot, A.; Martiny, L.; Debelle, L.; et al. Matrix ageing and vascular impacts: Focus on elastin fragmentation. *Cardiovasc. Res.* **2016**, *110*, 298–308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Astrand, H.; Stalhand, J.; Karlsson, J.; Karlsson, M.; Sonesson, B.; Länne, T. In vivo estimation of the contribution of elastin and collagen to the mechanical properties in the human abdominal aorta: Effect of age and sex. *J. Appl. Physiol.* **2011**, *110*, 176–187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Hodis, S.; Zamir, M. Mechanical events within the arterial wall: The dynamic context for elastin fatigue. *J. Biomech.* **2009**, *42*, 1010–1016. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Greenwald, S.E. Ageing of the conduit arteries. *J. Pathol.* **2007**, *211*, 157–172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Basalyga, D.M.; Simionescu, D.T.; Xiong, W.; Baxter, B.T.; Starcher, B.C.; Vyavahare, N.R. Elastin degradation and calcification in an abdominal aorta injury model: Role of matrix metalloproteinases. *Circulation* **2004**, *110*, 3480–3487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Mackenzie, I.S.; Wilkinson, I.B.; Cockcroft, J.R. Assessment of arterial stiffness in clinical practice. *QJM* **2002**, *95*, 67–74. [[CrossRef](#)]
28. Lee, H.-Y.; Oh, B.-H. Aging and arterial stiffness. *Circ. J.* **2010**, *74*, 2257–2262. [[CrossRef](#)]
29. Hayashi, A.; Suzuki, T.; Wachi, H.; Tajima, S.; Nishikawa, T.; Murad, S.; Pinnell, S.R. Minoxidil stimulates elastin expression in aortic smooth muscle cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *315*, 137–141. [[CrossRef](#)]

30. Tsoporis, J.; Keeley, F.W.; Lee, R.M.; Leenen, F.H. Arterial vasodilation and vascular connective tissue changes in spontaneously hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1998**, *31*, 960–962. [[CrossRef](#)]
31. Slove, S.; Lannoy, M.; Behmoaras, J.; Pezet, M.; Sloboda, N.; Lacolley, P.; Escoubet, B.; Buján, J.; Jacob, M.-P. Potassium channel openers increase aortic elastic fiber formation and reverse the genetically determined elastin deficit in the BN rat. *Hypertension* **2013**, *62*, 794–801. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Bouider, N.; Fhayli, W.; Ghandour, Z.; Boyer, M.; Harrouche, K.; Florence, X.; Pirotte, B.; Lebrun, P.; Faury, G.; Khelili, S. Design and synthesis of new potassium channel activators derived from the ring opening of diazoxide: Study of their vasodilatory effect, stimulation of elastin synthesis and inhibitory effect on insulin release. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 1735–1746. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Coquand-Gandit, M.; Jacob, M.-P.; Fhayli, W.; Romero, B.; Georgieva, M.; Bouillot, S.; Estève, E.; Andrieu, J.-P.; Brasseur, S.; Bouyon, S.; et al. Chronic Treatment with Minoxidil Induces Elastic Fiber Neosynthesis and Functional Improvement in the Aorta of Aged Mice. *Rejuvenation Res.* **2017**, *20*, 218–230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Bouhedja, M.; Peres, B.; Fhayli, W.; Ghandour, Z.; Boumendjel, A.; Faury, G.; Khelili, S. Design, synthesis and biological evaluation of novel ring-opened cromakalim analogues with relaxant effects on vascular and respiratory smooth muscles and as stimulators of elastin synthesis. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *144*, 774–796. [[CrossRef](#)]
35. Knutsen, R.H.; Beeman, S.C.; Broekelmann, T.J.; Liu, D.; Tsang, K.M.; Kovacs, A.; Ye, L.; Danback, J.R.; Watson, A.; Wardlaw, A.; et al. Minoxidil improves vascular compliance, restores cerebral blood flow, and alters extracellular matrix gene expression in a model of chronic vascular stiffness. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2018**, *315*, H18–H32. [[CrossRef](#)]
36. Fhayli, W.; Boyer, M.; Ghandour, Z.; Jacob, M.P.; Andrieu, J.P.; Starcher, B.C.; Estève, E.; Faury, G. Chronic administration of minoxidil protects elastic fibers and stimulates their neosynthesis with improvement of the aorta mechanics in mice. *Cell. Signal.* **2019**, *62*, 109333. [[CrossRef](#)]
37. Sohm, B.; Cenizo, V.; André, V.; Zahouani, H.; Pailler-Mattei, C.; Vogelgesang, B. Evaluation of the efficacy of a dill extract in vitro and in vivo. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2011**, *33*, 157–163. [[CrossRef](#)]
38. Cenizo, V.; André, V.; Reymermier, C.; Sommer, P.; Damour, O.; Perrier, E. LOXL as a target to increase the elastin content in adult skin: A dill extract induces the LOXL gene expression. *Exp. Dermatol.* **2006**, *15*, 574–581. [[CrossRef](#)]
39. Behmoaras, J.; Slove, S.; Seve, S.; Vranckx, R.; Sommer, P.; Jacob, M.-P. Differential expression of lysyl oxidases LOXL1 and LOX during growth and aging suggests specific roles in elastin and collagen fiber remodeling in rat aorta. *Rejuvenation Res.* **2008**, *11*, 883–889. [[CrossRef](#)]
40. Faury, G.; Maher, G.M.; Li, D.Y.; Keating, M.T.; Mecham, R.P.; Boyle, W.A. Relation between outer and luminal diameter in cannulated arteries. *Am. J. Physiol.* **1999**, *277*, H1745–H1753. [[CrossRef](#)]
41. Smith, J.; Kampine, J. *Circulatory Physiology—The Essentials*, 3rd ed.; Williams & Wilkins: Baltimore, MD, USA, 1990.
42. Gibbons, C.A.; Shadwick, R.E. Functional similarities in the mechanical design of the aorta in lower vertebrates and mammals. *Experientia* **1989**, *45*, 1083–1088. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Barnett, C.P.; Chitayat, D.; Bradley, T.J.; Wang, Y.; Hinek, A. Dexamethasone normalizes aberrant elastic fiber production and collagen 1 secretion by Loeys-Dietz syndrome fibroblasts: A possible treatment? *Eur. J. Hum. Genet.* **2011**, *19*, 624–633. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Moravec, C.S.; Ruhe, T.; Cifani, J.R.; Milovanovic, M.; Khairallah, P.A. Structural and functional consequences of minoxidil-induced cardiac hypertrophy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1994**, *269*, 290–296. [[PubMed](#)]
45. Lowenthal, D.T.; Onesti, G.; Mutterperl, R.; Affrime, M.; Martinez, E.W.; Kim, K.E.; Busby, P.; Shirk, J.; Swartz, C. Long-term clinical effects, bioavailability, and kinetics of minoxidil in relation to renal function. *J. Clin. Pharmacol.* **1978**, *18*, 500–508. [[CrossRef](#)]
46. Jana, S.; Shekhawat, G.S. Anethum graveolens: An Indian traditional medicinal herb and spice. *Pharmacogn. Rev.* **2010**, *4*, 179–184.
47. Jana, S.; Shekhawat, G. Phytochemical Analysis and Antibacterial Screening of in vivo and in vitro Extracts of Indian Medicinal Herb: Anethum graveolens. *Res. J. Med. Plant.* **2010**, *4*, 206–212. [[CrossRef](#)]

48. Angeloni, C.; Leoncini, E.; Malaguti, M.; Angelini, S.; Hrelia, P.; Hrelia, S. Role of quercetin in modulating rat cardiomyocyte gene expression profile. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2008**, *294*, H1233–H1243. [[CrossRef](#)]
49. Quiñones, M.; Miguel, M.; Aleixandre, A. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacol. Res.* **2013**, *68*, 125–131. [[CrossRef](#)]
50. Testai, L.; Martelli, A.; Cristofaro, M.; Breschi, M.C.; Calderone, V. Cardioprotective effects of different flavonoids against myocardial ischaemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts. *J. Pharm. Pharmacol.* **2013**, *65*, 750–756. [[CrossRef](#)]
51. Schroeter, H.; Heiss, C.; Balzer, J.; Kleinbongard, P.; Keen, C.L.; Hollenberg, N.K.; Sies, H.; Kwik-Urbe, C.; Schmitz, H.H.; Kelm, M. (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 1024–1029. [[CrossRef](#)]
52. Thring, T.S.A.; Hili, P.; Naughton, D.P. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complement. Altern. Med.* **2009**, *9*, 27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Jimenez, F.; Mitts, T.F.; Liu, K.; Wang, Y.; Hinek, A. Ellagic and tannic acids protect newly synthesized elastic fibers from premature enzymatic degradation in dermal fibroblast cultures. *J. Investig. Dermatol.* **2006**, *126*, 1272–1280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Negrão, M.R.; Keating, E.; Faria, A.; Azevedo, I.; Martins, M.J. Acute effect of tea, wine, beer, and polyphenols on ecto-alkaline phosphatase activity in human vascular smooth muscle cells. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4982–4988. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Lomashvili, K.A.; Cobbs, S.; Hennigar, R.A.; Hardcastle, K.I.; O'Neill, W.C. Phosphate-induced vascular calcification: Role of pyrophosphate and osteopontin. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2004**, *15*, 1392–1401. [[CrossRef](#)]
56. Le Lièvre, C.S.; Le Douarin, N.M. Mesenchymal derivatives of the neural crest: Analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **1975**, *34*, 125–154.
57. Jiang, X.; Rowitch, D.H.; Soriano, P.; McMahon, A.P.; Sucov, H.M. Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development* **2000**, *127*, 1607–1616.
58. Lin, P.H.; Chaikof, E.L. Embryology, anatomy, and surgical exposure of the great abdominal vessels. *Surg. Clin. N. Am.* **2000**, *80*, 417–433. [[CrossRef](#)]
59. Pfaltzgraff, E.R.; Bader, D.M. Heterogeneity in vascular smooth muscle cell embryonic origin in relation to adult structure, physiology, and disease. *Dev. Dyn.* **2015**, *244*, 410–416. [[CrossRef](#)]
60. Gadson, P.F., Jr.; Dalton, M.L.; Patterson, E.; Svoboda, D.D.; Hutchinson, L.; Schram, D.; Rosenquist, T.H. Differential response of mesoderm- and neural crest-derived smooth muscle to TGF-beta1: Regulation of c-myb and alpha1 (I) procollagen genes. *Exp. Cell Res.* **1997**, *230*, 169–180. [[CrossRef](#)]
61. Pfaltzgraff, E.R.; Shelton, E.L.; Galindo, C.L.; Nelms, B.L.; Hooper, C.W.; Poole, S.D.; Labosky, P.A.; Bader, D.M.; Reese, J. Embryonic domains of the aorta derived from diverse origins exhibit distinct properties that converge into a common phenotype in the adult. *J. Mol. Cell Cardiol.* **2014**, *69*, 88–96. [[CrossRef](#)]
62. Simons, P.C.; Algra, A.; Bots, M.L.; Grobbee, D.E.; van der Graaf, Y. Common carotid intima-media thickness and arterial stiffness: Indicators of cardiovascular risk in high-risk patients. The SMART Study (Second Manifestations of ARterial disease). *Circulation* **1999**, *100*, 951–957. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Arnett, D.K.; Evans, G.W.; Riley, W.A. Arterial stiffness: A new cardiovascular risk factor? *Am. J. Epidemiol.* **1994**, *140*, 669–682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Matsumoto, Y.; Hamada, M.; Hiwada, K. Aortic distensibility is closely related to the progression of left ventricular hypertrophy in patients receiving hemodialysis. *Angiology* **2000**, *51*, 933–941. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Qin, F.; Siwik, D.A.; Luptak, I.; Hou, X.; Wang, L.; Higuchi, A.; Weisbrod, R.M.; Ouchi, N.; Tu, V.H.; Calamaras, T.D.; et al. The polyphenols resveratrol and S17834 prevent the structural and functional sequelae of diet-induced metabolic heart disease in mice. *Circulation* **2012**, *125*, 1757–1764. [[CrossRef](#)]
66. Safar, M.E.; Levy, B.I.; London, G.M. Arterial structure in hypertension and the effects of angiotensin converting enzyme inhibition. *J. Hypertens. Suppl.* **1992**, *10*, S51–S57. [[CrossRef](#)]
67. Bayer, I.M.; Adamson, S.L.; Langille, B.L. Atrophic remodeling of the artery-cuffed artery. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1999**, *19*, 1499–1505. [[CrossRef](#)]
68. Bény, J.L.; Brunet, P.C. Electrophysiological and mechanical effects of substance P and acetylcholine on rabbit aorta. *J. Physiol.* **1988**, *398*, 277–289. [[CrossRef](#)]

69. Brunner, F.; Kühberger, E.; Brockmeier, D.; Kukovetz, W.R. Evidence for muscarinic receptors in endothelial cells from combined functional and binding studies. *Eur. J. Pharmacol.* **1990**, *187*, 145–154. [[CrossRef](#)]
70. Shetty, S.S.; Okada, T.; Webb, R.L.; DelGrande, D.; Lappe, R.W. Functionally distinct endothelin B receptors in vascular endothelium and smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *191*, 459–464. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### 5.1.2 Principaux résultats et discussion de l'article 2

A ce jour, il n'existe pas de traitement pharmacologique curatif ou préventif permettant de pallier à l'altération des fibres élastiques en améliorant qualitativement et/ou quantitativement les fibres élastiques de la paroi artérielle. Différentes stratégies ont été expérimentées ces dernières années avec des effets prometteurs sur les artères de modèles murins ou des modèles de culture cellulaires pour induire la néosynthèse de fibres élastiques et/ou l'augmentation d'expression de la tropoélastine ou encore des lysyl oxydases. Cependant, à ce jour, la plupart des stratégies testées ont présenté soit des effets secondaires incompatibles avec leur utilisation, soit une efficacité clinique insuffisante (Fhayli, Boëté et al. 2019). Par exemple, le minoxidil, ouvreur de canaux potassiques provoque une hypertrophie cardiaque ou encore des épanchements péricardiques pouvant mener à une tamponnade cardiaque (Oye, Oye, et Ali 2021; Moravec et al. 1994). De plus, une étude clinique récente a montré une inefficacité de ce traitement lors d'essais cliniques (Kassai et al. 2019; Knutsen et al. 2022).

Notre étude montre que le traitement chronique par l'extrait d'aneth (EA) dans l'eau de boisson de souris mâles âgées protège les lames élastiques aortiques existantes en réduisant de 23 à 33% le nombre de ruptures de celles-ci liées à l'âge (extrait aneth 10%). Nous ne connaissons pas encore le mécanisme moléculaire mis en œuvre, mais il est probable que l'effet protecteur de l'aneth pourrait être lié aux polyphénols, par exemple les tanins et les flavonoïdes, présents dans les graines d'aneth (S. Jana et Shekhawat 2010; Sonali Jana et Shekhawat 2010). Certaines études ont montré que les polyphénols ont un effet bénéfique sur le système cardiovasculaire grâce à leur activité antioxydante (Angeloni et al. 2008; Quiñones, Miguel, et Aleixandre 2013; Testai et al. 2013). De plus, les polyphénols réduisent de manière dose-dépendante l'activité de différentes enzymes capables de dégrader l'élastine appartenant aux familles des sérine-protéinases, cystéine-protéinases et métallo-protéinases (Jimenez et al. 2006; Thring, Hili, et Naughton 2009). Enfin, les polyphénols inversent la calcification des fibres élastiques liée à l'âge par l'inhibition de l'activité de la phosphatase alcaline (Negrão et al. 2006; Lomashvili et al. 2004). De façon intéressante, l'EA à 10% induit également une augmentation de la quantité d'ARNm de tropoélastine et de *Loxl-1*, deux contributeurs majeurs de la synthèse et de l'assemblage de fibres élastiques, en accord avec les effets de l'aneth observés sur fibroblastes en culture par l'équipe de Cenizo et al. (Cenizo et al. 2006). Cette constatation est renforcée par l'observation histologique d'une néosynthèse de fibres élastiques induite par l'EA, ainsi qu'une augmentation significative de la quantité d'élastine produite *in vitro* par des cultures de CMLVs. Enfin, l'EA à 10% améliore les caractéristiques fonctionnelles de l'aorte ascendante notamment par un abaissement du module incrémental d'élasticité, reflet de la rigidité artérielle, et une augmentation de la distensibilité aortique. Cette amélioration des caractéristiques mécaniques aortiques pourrait expliquer l'inversion de l'hypertrophie cardiaque liée à l'âge par le traitement des animaux avec 10% d'extrait d'aneth, puisqu'une diminution de la rigidité artérielle conduit à une diminution de la post-charge cardiaque. Cette constatation est d'autant plus positive que des traitements comme le minoxidil, pourtant prometteurs du point de vue de la fonction artérielle, sont plus difficilement compatibles avec un traitement clinique de l'altération des fibres élastiques du fait d'un risque d'induire une hypertrophie cardiaque ou un épanchement péricardique pouvant provoquer une tamponnade cardiaque (Moravec et al. 1994; Oye, Oye, et Ali 2021). De plus, nos

résultats montrent de façon intéressante une limitation du processus de rigidification de la paroi aortique par le traitement à l'extrait d'aneth à 10% dans l'eau de boisson avec une restauration de la distensibilité artérielle à pressions physiologiques.

A l'instar de la SEP, le traitement par l'extrait d'aneth montre une différence d'effets en fonction des sexes. En effet, la réversion de l'hypertrophie cardiaque liée à l'âge n'est observée que chez les mâles et non les femelles pour des animaux traités avec de l'EA à 5% (résultats non encore publiés). Une hypothèse probable serait l'implication de mTOR (enzyme de la famille des sérine/thréonine kinases qui régule la prolifération cellulaire, la croissance cellulaire, la mobilité cellulaire, la survie cellulaire, la biosynthèse des protéines et la transcription) dans le processus d'hypertrophie cardiaque. En effet, une étude a montré que l'activation de mTOR chez des souris mâles induit une hypertrophie ventriculaire tandis que la même activation chez les femelles est un protecteur cardiaque (Gürgen et al. 2013). Or, le traitement *in vitro* par la quercétine (polyphénol présent en grande quantité dans l'aneth) (Möhle, Heller, et Wellmann 1985)) inhibe la signalisation de mTOR dans des cellules cancéreuses (Bruning 2013). Ainsi, l'aneth, *via* la quercétine et mTOR, pourrait provoquer une réduction significative de la masse des ventricules cardiaques seulement chez les souris mâles.

Le traitement chronique par l'extrait d'aneth induit la synthèse d'élastine *de novo*, préserve l'intégrité des lames élastiques au cours du vieillissement et améliore les propriétés biomécaniques de l'aorte de souris âgées. L'EA possède donc, outre son efficacité sur les fibres élastiques de la peau, des propriétés bénéfiques sur les fibres élastiques vasculaires. Il peut donc être considéré comme un produit anti-âge cardiovasculaire complémentaire de la SEP, cette dernière n'ayant pas montré d'efficacité lors d'une injection unique et un traitement aigu de 3 jours sur les souris âgées. Il pourrait être intéressant de tester un traitement chronique de la SEP sur les individus âgés et de le comparer à celui de l'extrait d'aneth, voire de combiner leurs effets. De plus, il pourrait être particulièrement intéressant de poursuivre les investigations sur l'extrait d'aneth dans le cadre d'altérations pathologiques des fibres élastiques comme le syndrome de Williams-Beuren et/ou le SVAS, ou encore dans le cadre de l'hypoxie intermittente et plus généralement du SAOS.

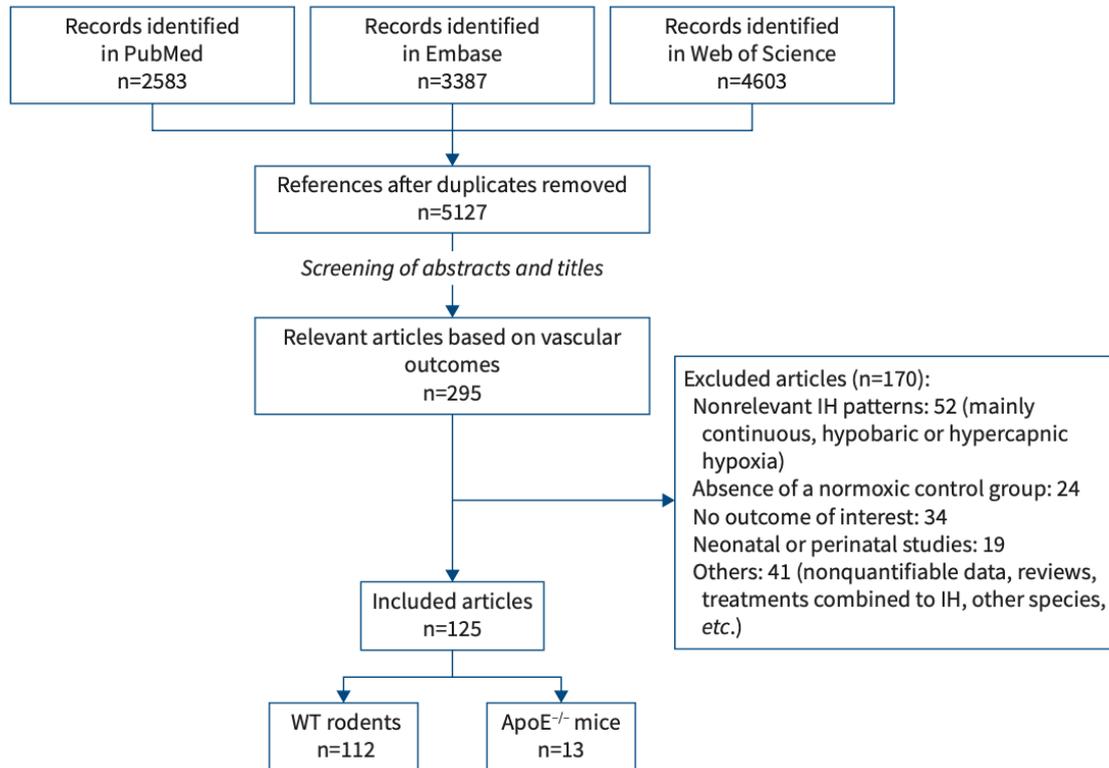
## 5.2 Article 3 : Meta-analyse des altérations de la structure et de la fonction vasculaires liées à l'hypoxie intermittente chez les rongeurs.

### 5.2.1 Introduction de l'article

Le syndrome d'apnée obstructive du sommeil est une maladie chronique très fréquente reconnue comme un facteur de risque majeur pour les maladies cardiovasculaires telles que l'hypertension, l'athérosclérose, les accidents vasculaires cérébraux et les infarctus du myocarde, entraînant ainsi une morbidité et une mortalité accrues (Lévy et al. 2015a; Ryan 2018). Parmi les mécanismes physiopathologiques du SAOS, l'hypoxie intermittente (HI) générée est considérée comme le mécanisme clé conduisant à la morbidité et à la mortalité cardiovasculaire (Lévy et al. 2015a; Ryan et al. 2020). Les études sur les rongeurs exposés à l'HI ont permis de déterminer la contribution de différentes voies physiopathologiques dans le déclenchement des conséquences cardiovasculaires *via* des mécanismes intermédiaires, tels que l'activation du système nerveux sympathique, le dysfonctionnement endothélial, l'inflammation, l'activation du facteur induit par l'hypoxie (HIF pour Hypoxia inducible factor) ou le stress oxydatif. De nombreuses études utilisant des modèles animaux ont soutenu l'hypothèse selon laquelle l'HI pourrait être responsable de l'augmentation de la pression artérielle (Dematteis et al. 2009; Fletcher et al. 1992), de la dégradation des fibres élastiques (Arnaud, Beguin, et al. 2011) du remodelage vasculaire structurel (Yang et al. 2011; Arnaud, Beguin, et al. 2011; Gras et al. 2016), de l'altération de la réactivité vasculaire (Totoson et al. 2013; Phillips et al. 2004) et de la progression de l'athérosclérose (Savransky et al. 2008; Arnaud, Poulain, et al. 2011; Drager et al. 2013). Cependant, certaines études n'ont montré aucun effet de l'HI sur les paramètres vasculaires mais également et surtout une hétérogénéité concernant l'ampleur des effets (M. Y. K. Lee et al. 2018; Lefebvre et al. 2006; Tuleta et al. 2014; S. Zhou et al. 2014). La contribution du SAOS et de l'HI dans la survenue de troubles cardiovasculaires est donc à préciser aussi bien dans les études cliniques que pré-cliniques puisqu'elle varie en fonction des différentes études qui parfois se contredisent (M. Zhou et al. 2017; Dematteis et al. 2009). D'une part, les études cliniques sont limitées lorsqu'il s'agit d'étudier un mécanisme précis du fait de la présence de nombreux facteurs confondants chez les patients, comme les comorbidités cardiovasculaires ou métaboliques associées au SAOS et l'impossibilité d'isoler l'hypoxie intermittente des autres phénomènes. D'autres part, concernant les études pré-cliniques, il n'y a pas de consensus sur un protocole d'hypoxie intermittente représentatif de la situation clinique, ce qui induit inévitablement de la variabilité dans les résultats publiés par les différentes équipes s'intéressant à cette problématique. En effet, en fonction du protocole d'HI (durée des cycles, ampleur de l'hypoxie, durée d'exposition journalière et/ou totale), en fonction des vaisseaux étudiés ou encore en fonction du modèle (espèce, âge, sexe, régime alimentaire), il est fréquent d'obtenir des divergences d'effet de l'HI.

L'objectif de cet article est donc de faire le point sur l'impact de l'hypoxie intermittente sur la structure et la fonction vasculaire dans des modèles murins, d'identifier les principaux facteurs d'hétérogénéité des résultats et d'éventuellement dégager un protocole d'HI qui ferait le consensus et serait le modèle se rapprochant le plus de la physiopathologie humaine afin de l'appliquer dans les laboratoires qui le souhaiteraient.

Pour cela, nous avons réalisé une étude exhaustive, à partir des données de la littérature. Une première recherche a été menée dans les bases de données Pubmed, EMBASE et Web of Science en utilisant les mots clés "intermittent hypoxia" ET "rodent" OU "mice" OU "rat". Cette première recherche a abouti à 5127 références qui ont été analysées sur la base des titres et des résumés par deux lecteurs indépendants pour sélectionner les articles rédigés en anglais ayant étudié l'effet de l'HI sur des paramètres vasculaires de modèles de rongeurs (Figure 72).



**Figure 72 - Diagramme de flux de l'étude. IH : hypoxie intermittente ; WT : type sauvage ; ApoE<sup>-/-</sup> : apolipoprotéine E knockout.**

Sur les 5127 articles analysés (titre et résumé), seulement 295 articles ont été reconnus comme pertinents par au moins deux lecteurs. L'ensemble de ces 295 articles ont été lus dans leur intégralité et inclus ou exclus de l'étude en fonction de critères fixés en amont. Les critères d'inclusions étant :

- Le phénotype des rongeurs doit être sauvage, pas d'animaux génétiquement modifiés (à l'exception des rongeurs ApoE<sup>-/-</sup> inclus pour analyser la taille des lésions d'athérosclérose),
- L'étude doit nécessairement présenter aussi les résultats obtenus sur un groupe témoin normoxique pris comme référence,
- Plusieurs cycles d'hypoxie intermittente doivent se répéter au cours de la même journée pendant une durée minimale d'un jour,
- L'étude doit présenter des résultats concernant au moins un paramètre caractérisant la structure, la fonction vasculaire systémique (réactivité artérielle, remodelage et taille des lésions d'athérosclérose) ou la pression artérielle.

A *contrario*, nous avons exclu les études :

- S'intéressant à l'effet de l'hypoxie intermittente sur des modèles de rongeurs génétiquement modifiés (à l'exception des rongeurs ApoE<sup>-/-</sup>),
- Sans groupe témoin normoxique,
- Les études utilisant l'hypoxie continue ou l'hypoxie intermittente associée à des conditions hypercapniques ou hypobariques,
- Utilisant l'hypoxie intermittente pendant des périodes prénatales ou néonatales,
- Les études analysant des paramètres vasculaires sur des artères pulmonaires, rétiniennes ou cérébrales.

A l'issue de ce tri, 125 études ont finalement été incluses dans la méta-analyse, incluant 112 études chez des rongeurs de phénotype sauvage et 13 études chez des souris ApoE<sup>-/-</sup>. Les souris ApoE<sup>-/-</sup> ont été exclusivement étudiées dans le cadre de l'étude de la taille de lésion d'athérosclérose, alors que les données sur la structure, la fonction vasculaire ainsi que celles sur la pression artérielle n'ont pas été comparées à celles des autres études sur rongeurs de phénotype sauvage (Figure 72).

Pour chaque caractéristiques étudiées, les résultats sont exprimés en différence moyenne standardisée (SMD pour standardised Mean Difference) sous la forme d'Orchard Plot (Figure 73) :

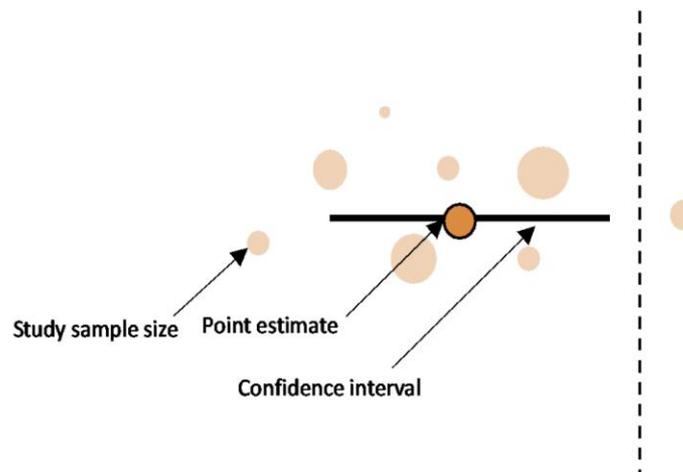
$$SMD = (Mc - Me) / SD$$

*Mc* : Moyenne de la mesure dans le groupe normoxique

*Me* : Moyenne de la mesure dans le groupe hypoxique

*SD* : Ecart type combiné des deux groupes

Selon les standards internationaux, l'effet est considéré comme important quand  $SMD > 0,8$  , modéré quand  $0,5 < SMD < 0,8$  et faible quand  $0,2 < SMD < 0,5$ .



**Figure 73 - Exemple d'Orchard Plot montrant la signification des différentes parties du diagramme. (Harki et al. 2022)**

Enfin, dans le but de mesurer la qualité de l'étude et de détecter d'éventuelles biais, les articles analysés ont été évalués à l'aide de l'outil SYRCLE qui décrit différents risques de biais :

- Biais de sélection (sélection des groupes selon les caractéristiques des animaux au départ)
- Biais de performance (absence de randomisation au niveau des cages, pas de traitement en aveugle des animaux)
- Biais de détection (pas de randomisation des animaux pour les analyses, pas de mesure en aveugle des paramètres biologiques)
- Biais d'attrition (données manquantes)
- Biais de déclaration (déclaration sélective des résultats).

Ainsi, chaque risque de biais est noté comme faible, élevé ou peu clair en fonction des données fournies dans l'article, les études reçoivent donc un score SYRCLE global qui sera pris en compte si le risque de biais est élevé (Hooijmans et al. 2014).



# Intermittent hypoxia-related alterations in vascular structure and function: a systematic review and meta-analysis of rodent data

Olfa Harki<sup>1</sup>, Quentin Boete<sup>1</sup>, Jean-Louis Pépin<sup>1</sup>, Claire Arnaud <sup>1</sup>, Elise Belaidi<sup>1</sup>, Gilles Faury<sup>1</sup>, Charles Khouri <sup>1,2,3</sup> and Anne Briançon-Marjollet <sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Université Grenoble Alpes, INSERM, CHU Grenoble Alpes, HP2 Laboratory, Grenoble, France. <sup>2</sup>Pharmacovigilance Unit and Clinical Pharmacology Dept, Grenoble Alpes University Hospital, Grenoble, France. <sup>3</sup>C. Khouri and A. Briançon-Marjollet are co-last authors and have contributed equally to the work.

Corresponding author: Anne Briançon-Marjollet ([anne.briancon@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:anne.briancon@univ-grenoble-alpes.fr))



Shareable abstract (@ERSpublications)

This meta-analysis of rodent studies firmly establishes that intermittent hypoxia (IH), as a model of obstructive sleep apnoea, alters vascular pressure, remodelling and reactivity. Severity of IH and rodent characteristics contribute to this impact. <https://bit.ly/3fm45fB>

Cite this article as: Harki O, Boete Q, Pépin J-L, *et al.* Intermittent hypoxia-related alterations in vascular structure and function: a systematic review and meta-analysis of rodent data. *Eur Respir J* 2022; 59: 2100866 [DOI: 10.1183/13993003.00866-2021].

Copyright ©The authors 2022. For reproduction rights and permissions contact [permissions@ersnet.org](mailto:permissions@ersnet.org)

This article has an editorial commentary: <https://doi.org/10.1183/13993003.02438-2021>

Received: 23 March 2021  
Accepted: 25 July 2021

## Abstract

**Background** Obstructive sleep apnoea and the related intermittent hypoxia (IH) are widely recognised as risk factors for incident cardiovascular diseases. Numerous studies support the deleterious vascular impact of IH in rodents but an overall interpretation is challenging owing to heterogeneity in rodent species investigated and the severity and duration of IH exposure. To clarify this major issue, we conducted a systematic review and meta-analysis to quantify the impact of IH on systemic artery structure and function depending on the different IH exposure designs.

**Methods** We searched PubMed, Embase and Web of Science, and included 125 articles in a meta-analysis, among them 112 using wild-type rodents and 13 using apolipoprotein E knockout (ApoE<sup>-/-</sup>) mice. We used the standardised mean difference (SMD) to compare results between studies.

**Results** IH significantly increased mean arterial pressure (+13.90 (95% CI 11.88–15.92) mmHg), and systolic and diastolic blood pressure. Meta-regressions showed that mean arterial pressure change was associated with strain and year of publication. IH altered vasodilation in males but not in females and increased endothelin-1-induced but not phenylephrine-induced vasoconstriction. Intima-media thickness significantly increased upon IH exposure (SMD 1.10 (95% CI 0.58–1.62); absolute values +5.23 (2.81–7.84)  $\mu$ m). This increase was observed in mice but not in rats and was negatively associated with age. Finally, IH increased atherosclerotic plaque size in ApoE<sup>-/-</sup> mice (SMD 1.08 (95% CI 0.80–1.37)).

**Conclusions** Our meta-analysis established that IH, independently of other confounders, has a strong effect on vascular structure and physiology. Our findings support the interest of identifying and treating sleep apnoea in routine cardiology practice.

## Introduction

Obstructive sleep apnoea syndrome (OSAS) is one of the most frequent chronic diseases, affecting up to nearly 1 billion individuals worldwide [1], and is characterised by the repetitive occurrence of apnoeas and hypopnoeas during sleep [2]. OSAS is widely recognised as a risk factor for prevalent and incident cardiovascular diseases, including hypertension, atherogenesis, stroke and myocardial infarction, thus leading to increased morbidity and mortality [2–4]. Among OSAS pathophysiological mechanisms, intermittent hypoxia (IH) caused by repetitive hypoxia–reoxygenation cycles is thought to be the key intermediary mechanism leading to cardiovascular morbidity and mortality [2, 5, 6]. However, clinical studies are frequently partly flawed by confounders and the role of IH as an independent cardiovascular risk factor is still debated. It is crucial to establish from robust and consistent experimental data the role of

IH in increasing cardiovascular risk so as to better understand its contribution towards cardiovascular diseases.

Among OSA animal models developed in the last decades [5], IH exposure in rodents is by far the most commonly used worldwide. Studies on rodents exposed to IH have allowed us to dissect the contribution of different pathophysiological pathways and intermediary mechanisms such as sympathetic nervous system activation, endothelial dysfunction, inflammation or oxidative stress in triggering cardiovascular consequences. Many studies using animal models have supported the hypothesis that IH might be responsible for increased arterial blood pressure [5, 7], structural vascular remodelling [8–10], altered vascular reactivity [11, 12] and atherosclerosis progression [13–15]. However, some studies showed no effect of IH on vascular parameters (*e.g.* [16–19]) and there was heterogeneity regarding effect size. Inconsistency between studies might be explained by the disparity in rodent models and variations in patterns of IH exposure. Indeed, studies included mice or rats, predominantly males, but from different strains, of different ages and weights at baseline, and on different diets (standard *versus* high fat). There were also variations regarding the studied vascular beds, from large elastic to small muscular arteries, which might potentially account for substantial variability. Last but not least, IH patterns differed across studies. Animals were exposed to IH severities ranging from 5% to 10% inspiratory oxygen fraction ( $F_{IO_2}$ ), hypoxic phases varied from 6 to 12 h per day and desaturation–reoxygenation sequences lasted from 20 s to a few minutes, with the total duration of IH exposure ranging from a few days to up to several weeks or months.

With the goal of clarifying and strengthening our knowledge, we carried out a systematic review and meta-analysis addressing the overall impact of IH on vascular parameters, namely blood pressure, vascular remodelling, arterial function and atherosclerotic lesions in systemic arteries. Subgroup analyses and meta-regressions were performed to identify the main factors accounting for heterogeneity in results, with particular interest in assessing different rodent models and IH cycle characteristics.

## Methods

The protocol for the meta-analysis was recorded in PROSPERO with identifier number CRD42020169940. Owing to the very large amount of available data, this work focuses on structural and functional vascular outcomes.

### Search methods and study selection

We searched PubMed, Embase and Web of Science for articles published up to 16 April 2021. The search terms were “intermittent hypoxia” AND “rodent” OR “mice” OR “rats” (see PROSPERO record for exact query). We also searched for key words and Medical Subject Headings (MeSH) related to each search term. After the initial electronic search, we screened the titles and the abstracts to retrieve relevant articles. Eligibility was considered if the articles were written in English and addressed vascular outcomes of IH in rodents. Then, the full articles were screened for inclusion and exclusion criteria. Two authors independently screened all references for inclusion and any discrepancies were resolved by discussion among the team.

We included only controlled studies with a well-established control group, *i.e.* normoxic animals, for adult rodents exposed to chronic IH. An IH cycle was defined as the repetitive occurrence of several hypoxia–reoxygenation sequences during the same day. Chronic IH was defined as a repetition of IH cycles over time, for a minimum of 1 day. All wild-type rodent models (mouse and rat, male and female, young or aged, lean or obese) with exposure to IH and compared with a normoxic group were included.

The outcomes considered as mandatory for inclusion were variables allowing characterisation of vascular structure or function. These included blood pressure (systolic (SBP)/diastolic (DBP)/mean/pulsed), arterial reactivity (vasodilatory response to  $10^{-6}$  M acetylcholine and vasoconstriction responses to  $10^{-6}$  M phenylephrine or  $10^{-8}$  M endothelin-1, both *ex vivo* in cannulated vessels or vessel rings), vascular remodelling (intima–media thickness (IMT) and internal vessel diameter) and atherosclerosis plaque size in apolipoprotein E knockout (ApoE<sup>-/-</sup>) mice.

We excluded studies without any control group (normoxic and untreated mice), studies in which hypoxia was applied continuously (*i.e.* no hypoxia–normoxia cycles) and studies in which hypoxia was combined with hypercapnic or hypobaric conditions. We also excluded studies using IH exposure in prenatal or perinatal periods and studies using transgenic animals, except for ApoE<sup>-/-</sup> mice that are the model of choice to study atherosclerosis plaques. Studies on pulmonary, retinal or cerebral vascular beds were also excluded.

### Assessment of methodological quality

The quality assessment of studies was performed using the SYRCLE tool described by HOOIJMANS *et al.* [20]. This contains several types of bias: selection bias (sequence generation, baseline characteristics and allocation concealment), performance bias (randomised housing of animals and blinding of investigators), detection bias (random outcome assessment and blinding of outcome assessor), attrition bias (incomplete outcome data) and reporting bias (selective outcome reporting). Each risk of bias was scored as high, low or unclear. Three authors were involved and every discrepancy was discussed to achieve a shared decision.

### Statistical analysis

We performed two separate meta-analyses for wild-type rodents and ApoE<sup>-/-</sup> mice. For each outcome, data were abstracted and analysed using standardised mean difference (SMD) =  $(M_c - M_e) / SD$ , where  $M_c$  is the mean of the outcome measure in the control group,  $M_e$  is the mean of the outcome measure in the experimental group and  $SD$  is the pooled standard deviation of the two groups [21]. SMD >0.8 was considered as large, 0.5–0.8 as moderate and 0.2–0.5 as small [21]. In case of a missing standard deviation we calculated or estimated it from confidence intervals, standard errors, t-values, p-values or F-values [22]. The remaining standard deviations were imputed using the mean outcome-specific standard deviation from other included studies. All results are represented using orchard plots, an innovative data visualisation tool well adapted for displaying the results of a large number of outcomes (supplementary figure S1) [23].

To facilitate interpretation of some results, we also performed meta-analyses using natural mean differences for arterial pressure outcomes. We have back-transformed SMD to natural mean differences using the median standard deviation from the control groups of included studies using the target unit for IMT outcome [24]. SMD are expressed with 95% confidence intervals. For study descriptions, we used median and interquartile range (IQR).

Given the high anticipated heterogeneity in included studies, we performed random effects meta-analysis by the restricted maximum-likelihood estimator method [25]. Moreover, to account for correlation among multi-arm studies we constructed a hierarchical/mixed effect model with a random intercept for study. We explored sources of heterogeneity through pre-specified subgroup analyses and meta-regressions according to population (species, strain, gender, age, diet and body weight), year of publication and details of IH protocols ( $F_{IO_2}$  during hypoxic phases, duration of hypoxic and normoxic phases, frequency, duration per day, and total duration of exposure).

Given the large number of studied outcomes, we performed meta-regressions only on pre-specified primary outcomes: mean arterial pressure (MAP), IMT, response of vessel rings to acetylcholine and atherosclerosis lesion size in ApoE<sup>-/-</sup> mice. We first performed univariate meta-regressions on study and animal characteristics (age and body weight were adjusted on species). We then added the significant predictors ( $p < 0.2$ ) in meta-regression models evaluating IH protocol parameters. Given the exploratory nature of these analyses we considered all p-values <0.05 as significant. Lastly, to assess the robustness of the findings, we performed sensitivity analyses by excluding potential outliers for significant meta-regressions.

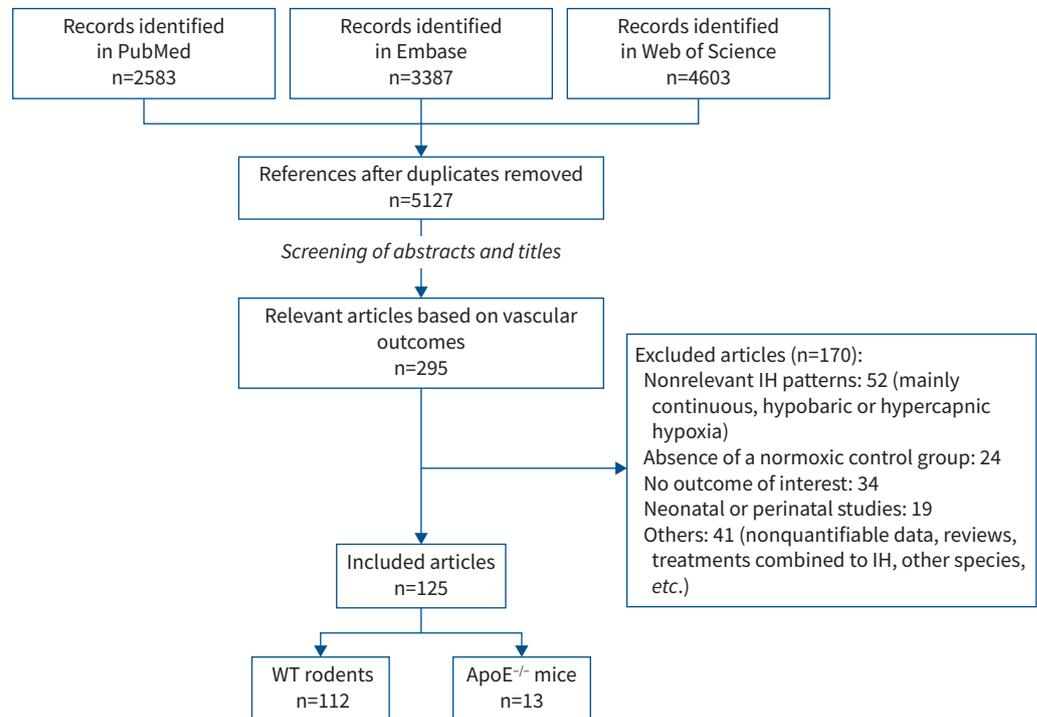
Funnel plot asymmetry was also explored for primary outcomes using Egger's regression test, as recommended by the Cochrane Handbook for Systemic Reviews of Interventions [26], with  $p < 0.1$  suggesting publication bias. We also performed a trim-and-fill analysis to assess the impact of small study effects on the meta-analyses results [27].

All statistical analyses were performed using R version 3.6.2 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)).

### Results

Our literature review yielded 5127 references, among which we ultimately selected 125 studies for inclusion in the meta-analysis: 112 in wild-type rodents and 13 using ApoE<sup>-/-</sup> mice (figure 1). Supplementary table S1 and supplementary figure S2 present vascular outcomes available across the studies, settings of hypoxic exposure and experimental designs.

Among the 112 studies on wild-type rodents, 24 were performed in mice (23 in C57BL/6 mice and one in 129S1 mice) and 88 in rats (60 in Sprague-Dawley, 24 in Wistar and four in other strains of rats). At study inclusion, median (IQR) body weight and age were 25.75 (22.1–27.1) g and 8.0 (7–11) weeks for mice and 275 (200–325) g and 9 (8–12.7) weeks for rats, respectively. Males were used in 103 studies, females in four studies, and both males and females in one study, and four studies did not report the sex of the animals. Animals received standard diet in 93 studies, high-fat diet in one study, and both standard and high-fat diet in four studies; diet was not specified in 13 studies.



**FIGURE 1** Flow diagram of the study. IH: intermittent hypoxia; WT: wild-type; ApoE<sup>-/-</sup>: apolipoprotein E knockout.

For the studies in ApoE<sup>-/-</sup> mice, median (IQR) weight was 27 (25.9–29.5) g and age was 12 (8–14) weeks. Nine studies used males, three used both males and females, and one did not report the sex. The diet was standard in five studies, high fat in six studies, and both standard and high fat in two studies.

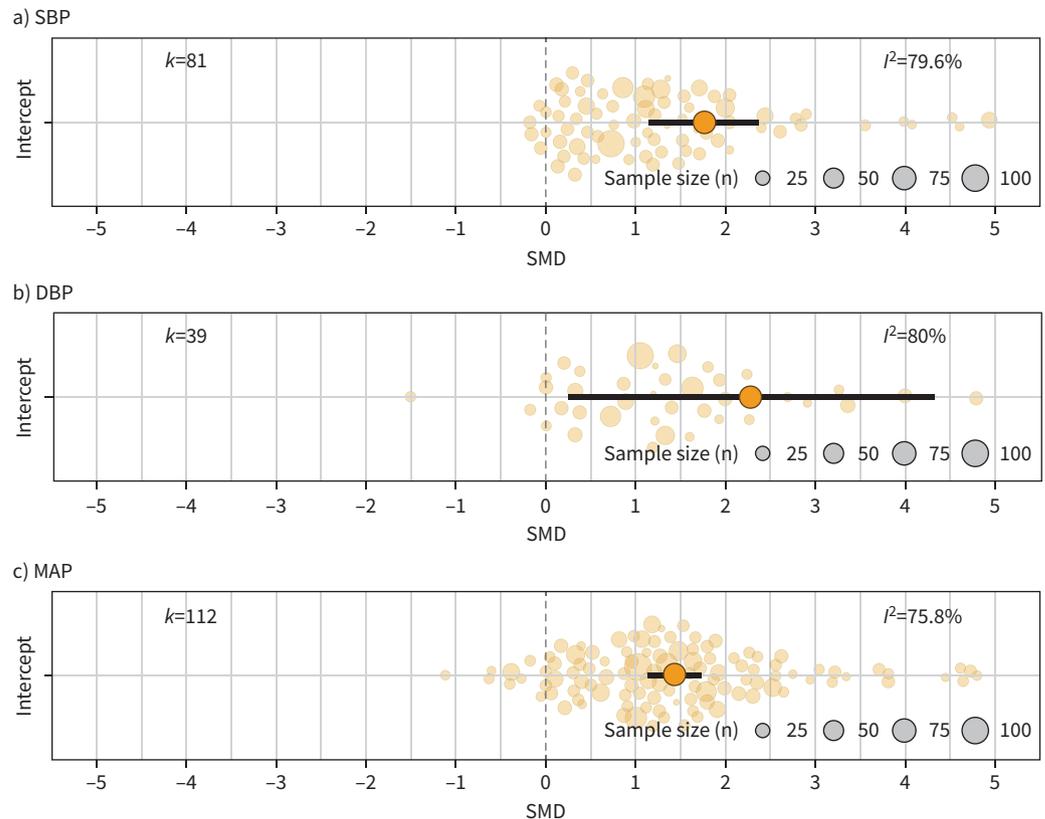
Concerning IH protocols (supplementary figure S2), median (IQR) values of  $F_{IO_2}$  during hypoxic periods were 5.25% (5–9%), desaturation during 60 (30–102.5) s followed by 90 (30–217.5) s of reoxygenation and return to a  $F_{IO_2}$  of 21% (normoxia). Cycles were repeated on average for 8 h per day for a median (IQR) duration of 21 (10–35) days. 43% of studies used a  $F_{IO_2}$  of 5%, 11% used a  $F_{IO_2}$  of 6% and 19% used a  $F_{IO_2}$  of 10% during hypoxic phases. 14% of studies had a duration of 7 days, 19% a duration of 14 days, 11% a duration of 21 days, 8% a duration of 28 days and 22% a duration of 35 days; in total, 14% of studies exposed for  $\geq 42$  days.

The number of included studies for each outcome is shown in supplementary table S1. Outcomes were excluded from statistical analysis when less than three studies reported them. In wild-type animals, this was the case for pulsed arterial pressure, atherosclerotic plaques, endothelial permeability, vasoconstriction in cannulated vessels and compliance/pulse wave velocity. In ApoE<sup>-/-</sup> mice, this was the case for all outcomes except for lesion size.

#### Impact of IH on arterial blood pressure

IH significantly increased SBP, DBP and MAP in systemic vessels of wild-type rodents (figure 2a–c). MAP SMD was 1.43 (95% CI 1.13–1.73;  $I^2=75.85\%$ ) corresponding to a mean increase of 13.90 (95% CI 11.88–15.92) mmHg after IH. Similarly, SBP increased by 13.13 (95% CI 10.80–15.47) mmHg and DBP by 12.24 (95% CI 9.01–15.47) mmHg. Forest plots for SBP, DBP and MAP expressed in mmHg are shown in supplementary figure S3a–c.

Subgroup analyses showed a significant heterogeneity according to strain (test for subgroup difference  $p<0.01$ ): MAP increased in mice (C57BL/6) as well as in rats (Wistar and Sprague-Dawley) but not in Fischer 344, Wistar Kyoto or lean Zucker rats, although the number of studies was very limited for these strains (table 1 and supplementary figure S4). Meta-regression analyses for IH parameters after adjustment



**FIGURE 2** Intermittent hypoxia increases blood pressure in systemic vessels of wild-type animals. Orchard plots showing standardised mean difference (SMD) for **a)** systolic blood pressure (SBP), **b)** diastolic blood pressure (DBP) and **c)** mean arterial pressure (MAP). *k* represents the number of effect sizes per estimate.

for significant confounders in univariate meta-regression (strain and year of publication) showed that a lower  $F_{IO_2}$  during hypoxic phases and total duration of exposure tended to be associated with a higher MAP ( $p=0.11$  and  $p=0.07$ , respectively). Moreover, total duration of exposure was significantly associated with MAP in multivariate meta-regressions after adjusting for all IH parameters ( $p=0.046$ ).

#### Impact of IH on arterial reactivity

Vasodilation tests, assessed on cannulated arteries as well as on arterial rings, showed that reactivity to acetylcholine ( $10^{-6}$  M) significantly decreased after IH in both cannulated arteries (SMD  $-1.26$  (95% CI  $-2.10$ – $-0.41$ );  $I^2=62.10\%$ ) (figure 3a) and arterial rings (SMD  $-2.53$  (95% CI  $-4.06$ – $-1.00$ );  $I^2=93.29\%$ ) (figure 3b). IH also increased vasoconstriction due to endothelin-1 ( $10^{-8}$  M) (SMD  $1.11$  (95% CI  $0.22$ – $2.01$ );  $I^2=0.00\%$ ) (figure 3c). However, there was no impact of IH on the vasoconstriction induced by phenylephrine ( $10^{-6}$  M) (SMD  $0.04$  (95% CI  $-0.60$ – $0.68$ );  $I^2=41.82\%$ ) (figure 3d).

Subgroup analyses showed that the IH-induced decrease in acetylcholine-dependent vasodilation was observed in male but not in female rodents (SMD  $0.12$  (95% CI  $-1.82$ – $2.06$ ) in females *versus*  $-1.78$  (95% CI  $-3.12$ – $-0.44$ ) in males;  $p<0.01$ ) (supplementary figure S5). Meta-regression analyses for IH parameters after adjustment for the significant confounder in univariate meta-regression (sex) showed that  $F_{IO_2}$  was significantly associated with vasodilation impairment, especially at moderate hypoxia levels (*i.e.* in the range of  $10\%$   $F_{IO_2}$ ) (figure 3e and table 1). However, after adjusting for the other IH parameters, this association did not persist ( $p=0.15$ ).

#### Impact of IH on vascular remodelling

In wild-type rodents, IMT significantly increased after IH (SMD  $1.10$  (95% CI  $0.58$ – $1.62$ );  $I^2=76.57\%$ ) (figure 4a) with an increase of IMT of  $5.23$  (95% CI  $2.81$ – $7.84$ )  $\mu\text{m}$ . In contrast, inner vessel diameter did not significantly change after IH (figure 4b). Subgroup analyses for IMT showed a much stronger effect of

**TABLE 1** Meta-regression analyses for the main outcomes: mean arterial pressure (MAP), dilation of artery rings, intima-media thickness (IMT) and atherosclerosis lesions in apolipoprotein E knockout (ApoE<sup>-/-</sup>) mice

Moderator	MAP			Artery ring dilation			IMT			ApoE <sup>-/-</sup> lesions		
	n	Slope	p-value	n	Slope	p-value	n	Slope	p-value	n	Slope	p-value
<b>Univariate meta-regressions</b>												
Strain	112		0.00 <sup>#,*</sup>	16	0.47	28	0.05 <sup>#,*</sup>	25	0.86			
Diet	102		0.62	16	0.37	NA		25	0.38			
Species	112		0.10	16	0.47	28	0.03 <sup>#,*</sup>	NA				
Gender	110		0.85	14	0.00 <sup>#</sup>	23	0.96	24	0.39			
Body weight	82	-0.001	0.07	12	0.041	0.06	17	-0.004	0.15 <sup>#</sup>	13	-0.145	0.06 <sup>#</sup>
Year of publication	112	0.029	0.05 <sup>#,*</sup>	16	-0.142	0.59	28	0.086	0.11 <sup>#</sup>	25	-0.038	0.38
Age	47	-0.015	0.15	12	0.0004	0.99	21	-0.026	0.014	20	0.012	0.72
<b>Univariate adjusted meta-regression on IH parameters</b>												
F <sub>IO<sub>2</sub></sub>	112	-0.103	0.11	16	-0.734	0.002*	28	0.118	0.61	25	0.260	0.32
Duration of exposure	112	0.015	0.07	16	-0.023	0.60	28	0.027	0.07	25	0.0011	0.68
Duration of IH per day	112	-0.073	0.55	16	0.050	0.90	28	-0.0003	0.99	25	0.044	0.63
Duration of reoxygenation phase	112	0.0014	0.30	16	-0.005	0.61	28	0.0011	0.86	25	-0.009	0.35
Duration of hypoxic phase	112	-0.0002	0.89	16	-3.744	0.07	28	0.0047	0.59	25	-0.005	0.38

IH: intermittent hypoxia; F<sub>IO<sub>2</sub></sub>: inspiratory oxygen fraction. #: p<0.2 indicates moderators included in the multivariate model to adjust meta-regressions on IH parameters. \*: p<0.05.

IH in mice (SMD 1.34 (95% CI 0.55–2.14)) than in rats (SMD 0.40 (95% CI -0.13–0.93)) (p=0.03 for subgroup difference) (supplementary figure S6). Univariate analysis also showed that age was negatively associated with IMT thickening (p=0.014) (figure 4c and table 1). Meta-regression analysis for IH parameters after adjustment for significant predictors in univariate meta-regression (strain, species, year of publication and age) were not significant for IMT at a p-value of 0.05, but total duration of exposure tended to be associated with IMT thickening (p=0.07) (figure 4d and table 1). After adjustment for other IH parameters in multivariate meta-regression, duration of exposure was significantly associated with IMT (p=0.046).

#### Impact of IH on atherosclerosis lesions in ApoE<sup>-/-</sup> mice

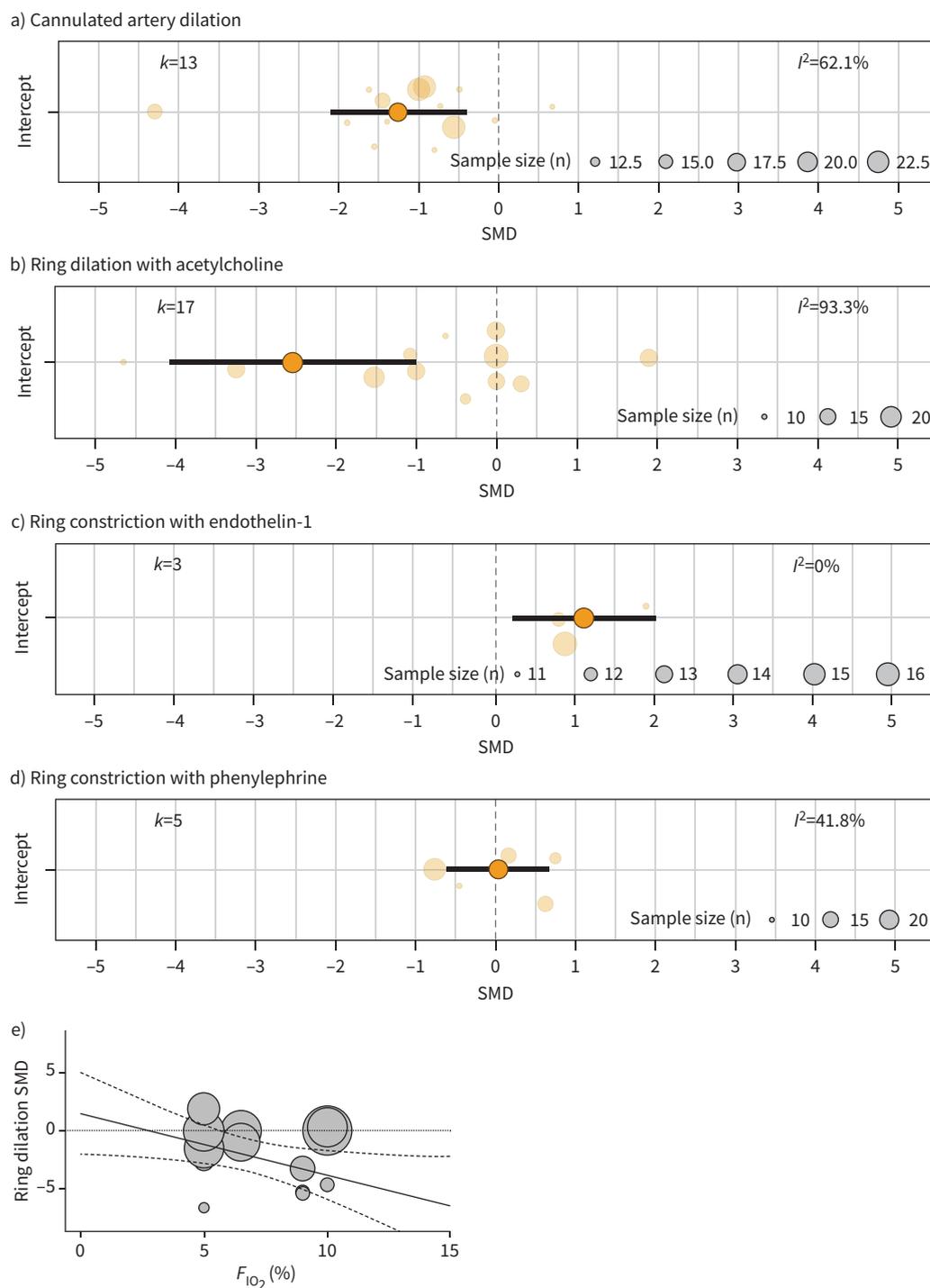
Since vascular remodelling is an early step in the process of atherogenesis and because wild-type C57BL/6 mice are resistant to atherosclerosis, we included ApoE<sup>-/-</sup> mice in the meta-analysis, as a recognised model of susceptibility to atherosclerosis. The analysis showed that IH strongly increased atheromatous lesion size in ApoE<sup>-/-</sup> mice (SMD 1.08 (95% CI 0.80–1.37); I<sup>2</sup>=27.5%) (figure 5). Meta-regression analysis for IH parameters showed that IH parameters were not significantly associated with lesion size in ApoE<sup>-/-</sup> mice, except for a strong trend towards significance regarding the animal's body weight (p=0.06) (table 1).

#### Risk of bias of studies

The risk of bias of studies was assessed using the SYRCLE tool [20]. The results are presented in supplementary figure S7 and supplementary table S2. Items for which the risk of bias was low were selective outcome reporting (selection bias, 35% of studies are at low risk), sequence generation (39% low risk), baseline characteristics (48% low risk) and incomplete outcome data (attrition bias, 56% low risk). However, incomplete outcome data was also the criterion with the highest percentage of high-risk studies (23%). Finally, several outcomes, mainly categorised as performance and detection bias, were almost never mentioned and therefore scored as “unclear risk”: allocation concealment, randomised housing, blinding of investigators, random outcome assessment and blinding of outcome assessor.

#### Small study effect

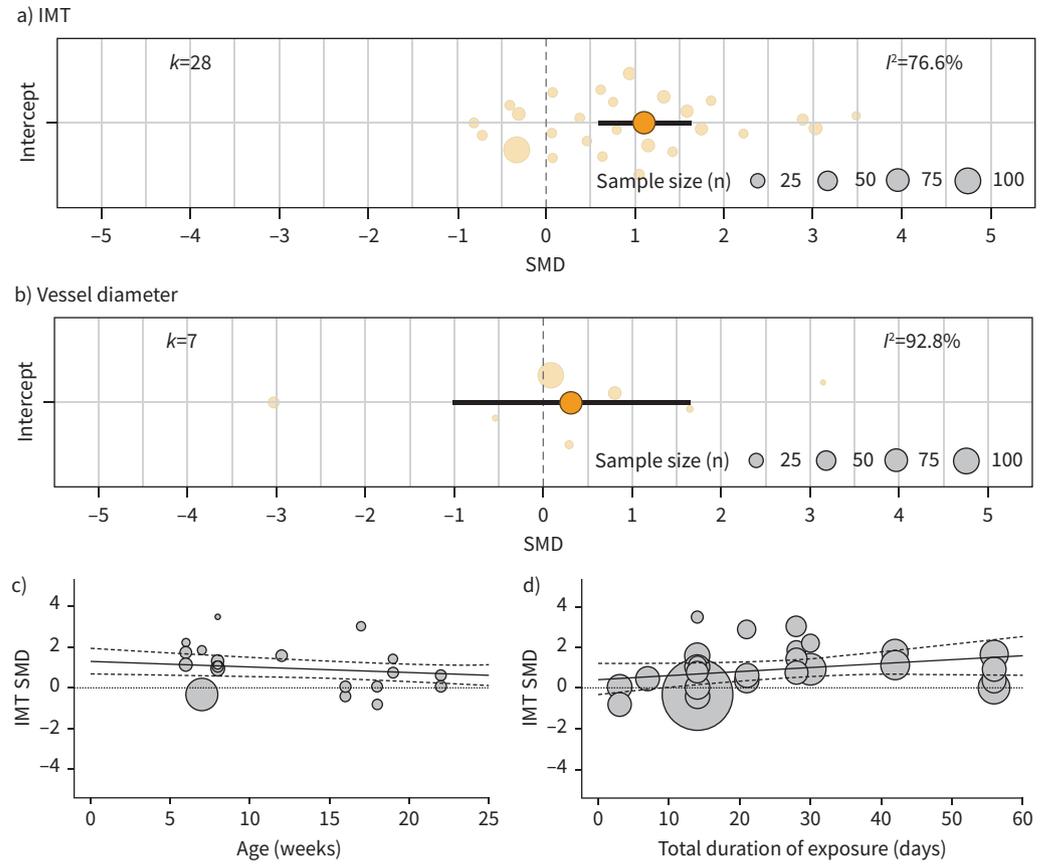
Funnel plots are presented in supplementary figure S8 for MAP, ring dilation, IMT and plaque size. For these four items, the asymmetric distribution of studies and a significant Egger regression test indicating a clear small study effect were observed. However, the SMD remained significant for all outcomes after correcting for missing studies (trim-and-fill analysis), meaning a consistent effect of IH on the outcomes (supplementary table S3).



**FIGURE 3** Intermittent hypoxia reduces vasodilation in response to acetylcholine and increases vasoconstriction in response to endothelin-1 but not to phenylephrine. Orchard plots showing standardised mean difference (SMD) for a) cannulated artery dilation, b) artery ring dilation with acetylcholine ( $10^{-6}$  M), c) artery ring constriction with endothelin-1 ( $10^{-8}$  M) and d) artery ring constriction with phenylephrine ( $10^{-6}$  M).  $k$  represents the number of effect sizes per estimate. e) Association between ring vasodilation and inspiratory oxygen fraction ( $F_{iO_2}$ ) ( $p < 0.01$ , slope  $-0.73$ ).

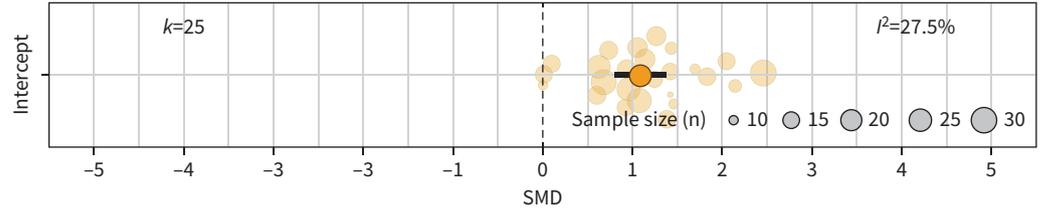
### Discussion

One of the main features of OSAS is IH, which represents the major trigger for cardiovascular complications [2]. A large corpus of studies in animals report diverse effect sizes for the impact of IH on



**FIGURE 4** Intermittent hypoxia provokes arterial wall structural remodelling. Orchard plots showing standardised mean difference (SMD) for **a)** intima–media thickness (IMT) of systemic arteries and **b)** vessel luminal diameter. *k* represents the number of effect sizes per estimate. **c)** Univariate meta-regressions showing the negative correlation between IMT and rodent age ( $p=0.014$ , slope  $-0.03$ ). **d)** Univariate adjusted meta-regression showing a strong trend towards positive correlation between IMT and total duration of exposure in days ( $p=0.07$ , slope  $0.03$ ).

vascular parameters such as arterial pressure, altered vascular reactivity or remodelling. However, there is heterogeneity or even inconsistencies among the published results and, to date, no meta-analysis has been done to assess the impact of IH on these specific parameters. Our meta-analysis firmly establishes that IH, in the absence of the confounders flawing human studies, triggers blood pressure elevation, alterations in vasodilation and atherosclerosis. Some of these responses were proportional to the hypoxic burden and duration of exposure. Another lesson was to delineate the different responses depending on the species, strains, sex and age of exposed animals.



**FIGURE 5** Intermittent hypoxia increases atherosclerotic plaque size in apolipoprotein E knockout (ApoE<sup>-/-</sup>) mice. Orchard plot showing standardised mean difference (SMD) for atherosclerosis lesion size. *k* represents the number of effect sizes per estimate.

### *Impact of IH on vascular parameters*

Our meta-analysis confirmed that IH has a clear and significant impact on the primary outcomes: arterial pressure, vessel reactivity, IMT and atherosclerotic lesions (SMD always >0.7). This is consistent with the known vascular effects of OSAS [2, 3], supporting the relevance of these IH models in rodents to human pathology. In particular, while clinical studies are often difficult to interpret due to comorbidities, rodent studies suggest that IH *per se* may be the main cause of the vascular consequences of OSA.

Our meta-analysis showed that IH is associated with a significant increase in MAP, which is consistent with the elevation in sympathetic activity and blood pressure occurring in healthy volunteers submitted to 14 nights of IH [28]. Interestingly, despite the lack of significance, meta-regression analyses suggest that  $F_{IO_2}$  (*i.e.* the hypoxic burden) tended to be associated with MAP ( $p=0.11$ ), suggesting that the severity of hypoxia could be a key element for increased risk of hypertension. This could be of high clinical significance since epidemiological studies [29, 30] already suggest a dose–response relationship between OSA severity, as defined by the apnoea–hypopnoea index (AHI), and hypertension. Also, responses to continuous positive airway pressure, the primary therapy for OSA, are related to the severity of hypoxia at the time of OSA diagnosis (see meta-analyses [31, 32]). This suggests that beyond confounders (*e.g.* obesity or metabolic syndrome) IH may be the main parameter accounting for increased blood pressure in OSA. It also suggests that parameters such as minimal oxygen saturation or time spent at <90% oxygen saturation should be used to describe more precisely OSA severity and hypoxic burden, rather than AHI which does not necessarily reflect the patient’s hypoxic burden.

In vascular reactivity studies, we observed that IH significantly altered endothelium-dependent vasodilation in response to acetylcholine. This is in line with studies in humans suggesting that OSA alters endothelial function [33] and is associated with arterial stiffness [34, 35]. Our group recently reported in an individual participant meta-analysis that among adults without overt cardiovascular disease, severe OSA (AHI  $\geq 30$  events·h<sup>-1</sup>) was independently associated with an increased risk of endothelial dysfunction that may predispose to late cardiovascular events [36]. Moreover, vasoconstriction in response to endothelin-1 was enhanced, while vasoconstriction in response to phenylephrine was not altered by IH. Other vasoconstrictors, such as angiotensin II, have only been sparsely studied and the lack of data did not allow a meta-analysis. Interestingly, endothelin-1-induced vasoconstriction was largely studied with IH protocols that included 5% carbon dioxide in the air breathed by animals. IH combined with hypercapnia also increased the contractile response to endothelin-1 [37, 38]. Our meta-analysis thus suggests that IH, rather than hypercapnia, may be responsible for the endothelin-1 response.

In this meta-analysis, we did not have sufficient statistical power to allow comparison of the reactivity of different vascular beds after IH. However, some studies report some differences in reactivity among vascular beds, in particular in small muscular *versus* large elastic arteries [38]. More studies are needed to allow a meta-analysis on the effects on various vascular beds.

IH-induced vascular remodelling in rodents, as characterised by an augmentation in the IMT, is consistent with what is observed in humans [39, 40]. Our results are also consistent with a recent meta-analysis limited to aorta IMT in mice [41]. Although not reaching significance in univariate analysis ( $p=0.07$ ), IMT was associated with the total duration of exposure in multivariate analysis. This suggests a progressive remodelling of arteries over time. Interestingly, internal vessel diameter was not modified in rodents, while in humans it is postulated that OSA could induce an increase in diameter, at least in some patients and vessels [42, 43]. IH models in rodents might rapidly attain the late characteristics of the disease such as thickening of the media following changes in the inner diameter of vessels. Other remodelling parameters, *e.g.* compliance or elasticity, could not be included in our meta-analysis due to insufficient studies. However, IH in rodents is known to induce disorganisation of the elastin fibre network [9, 44, 45], reduced vessel distension and increased stiffness [46, 47]. Taken together, IH induces structural remodelling along with alterations in vasoreactivity (blunted vasodilation and increased vasoconstriction) that could act synergistically to increase blood pressure.

Since increased IMT suggests ongoing atherogenesis in wild-type rodents, we included ApoE<sup>-/-</sup> mice in the meta-analysis because they are susceptible to atherosclerosis and a model of choice to study the impact of IH on atherosclerotic lesions. As expected, we found that IH strongly increased atherosclerotic lesions, consistent with the remodelling observed in wild-type animals [9] and with the known pro-atherogenic consequences of OSAS in humans [48, 49]. Interestingly, diet (standard *versus* high fat) did not significantly modulate plaque size after IH, suggesting that IH is a robust inducer of plaques, independent of a high-fat diet.

We performed meta-regression analyses to determine whether the variability of IH protocols could modulate the impact of IH. Apart from the associations mentioned earlier, other meta-regressions found no

significant effect of IH parameters on the selected vascular outcomes. This would suggest that IH has a robust impact on these outcomes, whatever the duration or severity of IH (in the range of our inclusion criteria). Interestingly,  $F_{IO_2}$  was always  $\leq 10\%$  in the included studies, corresponding to the very severe hypoxia that occurs in the most severe OSAS patients. A less severe hypoxic burden has been little investigated in animal experiment designs. This needs investigation in future animal studies because the impact of OSA treatments in reducing cardiovascular consequences is mostly debated for the mild-to-moderate spectrum of the disease.

#### *Contribution of animal characteristics to IH impact*

In univariate analyses, we investigated the contribution of strain, sex, age, diet, body weight and year of publication on IH effects. The species and/or the strain significantly impacted MAP and IMT, suggesting that the choice of species/strain of mice or rats is important when designing a study. MAP is consistently elevated in the most frequently used models such as C57BL/6 mice or Sprague-Dawley and Wistar rats. However, MAP was not found to be elevated in Fischer, Wistar Kyoto or lean Zucker rats, although the very small number of studies using these strains probably accounts for this absence of statistical effect. Vascular remodelling as assessed by IMT is much more pronounced in mice than in rats; rats may thus not be a good model to study remodelling. Our meta-analysis may help researchers to choose the most appropriate models according to the objectives of their study.

Analysis by sex showed that the alteration of vessel dilation induced by IH is found in males, but not in females, despite the small number of studies using females ( $n=5$ ), suggesting a robust difference in the impact of IH on vasodilation between males and females. This may reflect a sex-related sensitivity to the IH stimulus regarding this particular outcome, consistent with the known stimulation of endothelial-dependent vasodilation by oestrogens [50]. It may underlie the fact that, although most OSAS patients are men, specific studies of the vascular consequences of OSAS in women are necessary, although they are under-represented in the current literature [34, 51].

Animal age was inversely associated with IH-induced intima-media thickening, suggesting that young animals may be more sensitive to IH in terms of vascular remodelling. This is consistent with data in humans [32]. Age had no significant association with other parameters. However, the vast majority of studies were performed in young animals (8–9 weeks old) and the very few using animals older than 50 weeks had to be considered as outliers. There is a lack of information about the effects of IH in older animals, indicating a need for further studies, particularly as OSA is predominant in humans aged over 50 years and not in young adults.

Beside predominantly using young and male animals, animal models currently used present some limitations regarding their relevance for the clinical picture of OSA. First, only the IH component of sleep apnoea is modelled, while sleep fragmentation and increased respiratory efforts are not considered in the IH models. IH is generally applied during daytime, corresponding to rodent's sleep, but in some cases IH has been applied in awake animals. Moreover, in most models carbon dioxide is not controlled as OSA-related intermittent hypercapnia is difficult to mimic. Finally, IH applied to animals is generally severe: 43% of studies use a  $F_{IO_2}$  of 5% corresponding to severe OSA with arterial oxygen saturation ( $S_{aO_2}$ ) ranges achieving 60–80% [5] and only 19% of studies use a  $F_{IO_2}$  of 10% corresponding to  $S_{aO_2}$  variations encountered in moderate-to-severe OSA patients [5]. There is a need for implementing international consensus statements for fixing shared experimental protocols of IH exposures in terms of severity, circadian alignment and carbon dioxide monitoring.

#### *Risk of bias and limitations of the analysis*

Funnel plots and Egger regression tests evidenced a small study effect for all the outcomes studied. Such an effect could have multiple reasons: selective reporting of results or publication bias, nonexhaustive research strategy, poor methodological quality of small studies leading to overestimation of results, true heterogeneity in the results, or chance [52]. One of the potential limitations of our research strategy is the exclusion of non-English language studies because of the difficulty to assess the eligibility criteria of such studies, notably regarding IH protocols. However, interestingly the SMD remained stable for the four main outcomes after the trim-and-fill analyses correcting for missing values, suggesting a limited impact of the small study effect on the results. A publication bias is not unusual in animal studies, and is probably mainly due to selective reporting such as nonpublication of negative results and selection of publishable outcomes. This could be associated with the frequent reluctance of journals to publish negative results. To avoid this reporting bias, we suggest that journals accept to publish animal study protocols or negative results and that authors pre-register their protocols, as is done for clinical studies. For many of the listed items the risk of bias assessed with the SYRCLE risk-of-bias tool was quite high. This is in line with the

poor SYRACLE scores in many other animal study meta-analyses. We argue for improvement of research and publication practices with regard to laboratory animal studies, and the widespread adoption and implementation of the SYRACLE guidelines.

Another limitation of this meta-analysis was the heterogeneity of the outcomes and units of measurement. The use of SMD was intended to deal with this, but our analyses still showed strong heterogeneity for most of the outcomes studied. Statistical analyses only partly succeeded in identifying factors that could explain this heterogeneity, although some characteristics such as species, sex or certain IH properties were suggested. There may be other underlying factors that could potentially explain the heterogeneity of results that were not investigated in our study, such as laboratory-, experimentation- or investigator-dependent effects.

### Conclusions

To the best of our knowledge, this is the first meta-analysis of animal studies on the vascular impact of IH. The meta-analysis based on a large corpus of articles evidenced the clear impact of IH on arterial pressure, reactivity and vascular remodelling, summarised as a graphical abstract in supplementary figure S9. We identified some features of IH, in particular  $F_{IO_2}$  during hypoxia, which were sometimes associated with an amplified impact of IH. However, in most cases the impact of IH was independent of the precise pattern of IH exposure, suggesting that whatever its modality, aimed at mimicking OSA in humans, IH had a robust effect on rodent vessel structure and function.

Acknowledgements: The authors thank Axel Couturier (HP2 Laboratory, Grenoble, France) for helpful discussions, and Alison Foote (CHU Grenoble, Grenoble, France) for critical reading and English editing.

This study is registered at PROSPERO with identifier number CRD42020169940.

Conflict of interest: None declared.

Support statement: This work was supported by the Fondation du Souffle/Fondation pour la Recherche en Santé Respiratoire (PhD fellowship for O. Harki), Fondation de l'Avenir, Fondation Agir Pour les Maladies Chroniques and ANR Arterylastic grant ANR-18-CE-18-0001 (PhD fellowship for Q. Boete). Funding information for this article has been deposited with the Crossref Funder Registry.

### References

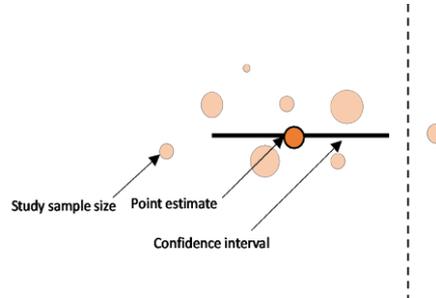
- 1 Benjafield AV, Ayas NT, Eastwood PR, *et al.* Estimation of the global prevalence and burden of obstructive sleep apnoea: a literature-based analysis. *Lancet Respir Med* 2019; 7: 687–698.
- 2 Lévy P, Kohler M, McNicholas WT, *et al.* Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nat Rev Dis Primer* 2015; 1: 15015.
- 3 Ryan S. Mechanisms of cardiovascular disease in obstructive sleep apnoea. *J Thorac Dis* 2018; 10: S4201–S4211.
- 4 Javaheri S, Barbe F, Campos-Rodriguez F, *et al.* Sleep apnea: types, mechanisms, and clinical cardiovascular consequences. *J Am Coll Cardiol* 2017; 69: 841–858.
- 5 Dematteis M, Godin-Ribuot D, Arnaud C, *et al.* Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding the human disease. *ILAR J* 2009; 50: 262–281.
- 6 Ryan S, Cummins EP, Farre R, *et al.* Understanding the pathophysiological mechanisms of cardiometabolic complications in obstructive sleep apnoea: towards personalised treatment approaches. *Eur Respir J* 2020; 56: 1902295.
- 7 Fletcher EC, Lesske J, Culman J, *et al.* Sympathetic denervation blocks blood pressure elevation in episodic hypoxia. *Hypertension* 1992; 20: 612–619.
- 8 Yang R, Sikka G, Larson J, *et al.* Restoring leptin signaling reduces hyperlipidemia and improves vascular stiffness induced by chronic intermittent hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 300: H1467–H1476.
- 9 Arnaud C, Beguin PC, Lantuejoul S, *et al.* The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184: 724–731.
- 10 Gras E, Belaidi E, Briançon-Marjollet A, *et al.* Endothelin-1 mediates intermittent hypoxia-induced inflammatory vascular remodeling through HIF-1 activation. *J Appl Physiol* 2016; 120: 437–443.
- 11 Totoson P, Fhayli W, Faury G, *et al.* Atorvastatin protects against deleterious cardiovascular consequences induced by chronic intermittent hypoxia. *Exp Biol Med* 2013; 238: 223–232.
- 12 Phillips SA, Olson EB, Morgan BJ, *et al.* Chronic intermittent hypoxia impairs endothelium-dependent dilation in rat cerebral and skeletal muscle resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286: H388–H393.

- 13 Savransky V, Jun J, Li J, *et al.* Dyslipidemia and atherosclerosis induced by chronic intermittent hypoxia are attenuated by deficiency of stearoyl coenzyme A desaturase. *Circ Res* 2008; 103: 1173–1180.
- 14 Arnaud C, Poulain L, Lévy P, *et al.* Inflammation contributes to the atherogenic role of intermittent hypoxia in apolipoprotein-E knock out mice. *Atherosclerosis* 2011; 219: 425–431.
- 15 Drager LF, Yao Q, Hernandez KL, *et al.* Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis via activation of adipose angiopoietin-like 4. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 188: 240–248.
- 16 Lee MYK, Ge G, Fung ML, *et al.* Low but not high frequency of intermittent hypoxia suppresses endothelium-dependent, oxidative stress-mediated contractions in carotid arteries of obese mice. *J Appl Physiol* 2018; 125: 1384–1395.
- 17 Lefebvre B, Godin-Ribuot D, Joyeux-Faure M, *et al.* Functional assessment of vascular reactivity after chronic intermittent hypoxia in the rat. *Respir Physiol Neurobiol* 2006; 150: 278–286.
- 18 Tuleta I, França CN, Wenzel D, *et al.* Hypoxia-induced endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice; effects of infliximab and L-glutathione. *Atherosclerosis* 2014; 236: 400–410.
- 19 Zhou S, Wang Y, Tan Y, *et al.* Deletion of metallothionein exacerbates intermittent hypoxia-induced oxidative and inflammatory injury in aorta. *Oxid Med Cell Longev* 2014; 2014: 141053.
- 20 Hooijmans CR, Rovers MM, de Vries RB, *et al.* SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med Res Methodol* 2014; 14: 43.
- 21 Cohen J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. New York, Routledge, 1988.
- 22 Higgins J, Green S. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions*. Version 5.1.0 (updated March 2011). 2011. <http://handbook.cochrane.org> Date last accessed: 7 August 2021.
- 23 Nakagawa S, Lagisz M, O'Dea RE, *et al.* The orchard plot: cultivating a forest plot for use in ecology, evolution, and beyond. *Res Synth Methods* 2021; 12: 4–12.
- 24 Murad, MH, Wang, Z, Chu, H, *et al.* When continuous outcomes are measured using different scales: guide for meta-analysis and interpretation. *BMJ* 2019; 364: k4817.
- 25 Viechtbauer W. Conducting meta-analyses in R with the metafor package. *J Stat Softw* 2010; 36: 1–48.
- 26 Higgins JPT, Thomas J, Chandler J, *et al.* *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions*. Version 6.1 (updated September 2020). 2020. [www.training.cochrane.org/handbook](http://www.training.cochrane.org/handbook) Date last accessed: 7 August 2021.
- 27 Duval S, Tweedie R. Trim and fill: a simple funnel-plot-based method of testing and adjusting for publication bias in meta-analysis. *Biometrics* 2000; 56: 455–463.
- 28 Tamisier R, Pépin JL, Rémy J, *et al.* 14 nights of intermittent hypoxia elevate daytime blood pressure and sympathetic activity in healthy humans. *Eur Respir J* 2011; 37: 119–128.
- 29 Peppard PE, Young T, Palta M, *et al.* Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N Engl J Med* 2000; 342: 1378–1384.
- 30 Young T, Peppard P, Palta M, *et al.* Population-based study of sleep-disordered breathing as a risk factor for hypertension. *Arch Intern Med* 1997; 157: 1746–1752.
- 31 Bratton DJ, Gaisl T, Wons AM, *et al.* CPAP vs mandibular advancement devices and blood pressure in patients with obstructive sleep apnea: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2015; 314: 2280–2293.
- 32 Pengo MF, Soranna D, Giontella A, *et al.* Obstructive sleep apnoea treatment and blood pressure: which phenotypes predict a response? A systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2020; 55: 1901945.
- 33 Wang Y, Xu H, Qian Y, *et al.* Patients with obstructive sleep apnea display decreased flow-mediated dilatation: evidence from a meta-analysis. *Med Sci Monit* 2017; 23: 1069–1082.
- 34 Jenner R, Fatureto-Borges F, Costa-Hong V, *et al.* Association of obstructive sleep apnea with arterial stiffness and nondipping blood pressure in patients with hypertension. *J Clin Hypertension* 2017; 19: 910–918.
- 35 Joyeux-Faure M, Tamisier R, Borel JC, *et al.* Contribution of obstructive sleep apnoea to arterial stiffness: a meta-analysis using individual patient data. *Thorax* 2018; 73: 1146–1151.
- 36 Bironneau V, Tamisier R, Trzepizur W, *et al.* Sleep apnoea and endothelial dysfunction: an individual patient data meta-analysis. *Sleep Med Rev* 2020; 52: 101309.
- 37 Allahdadi KJ, Walker BR, Kanagy NL. Augmented endothelin vasoconstriction in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension* 2005; 45: 705–709.
- 38 Allahdadi KJ, Walker BR, Kanagy NL. ROK contribution to endothelin-mediated contraction in aorta and mesenteric arteries following intermittent hypoxia/hypercapnia in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: H2911–H2918.
- 39 Nadeem R, Harvey M, Singh M, *et al.* Patients with obstructive sleep apnea display increased carotid intima media: a meta-analysis. *Int J Vasc Med* 2013; 2013: 839582.
- 40 Zhou M, Guo B, Wang Y, *et al.* The association between obstructive sleep apnea and carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Angiology* 2017; 68: 575–583.
- 41 Umeda A, Miyagawa K, Mochida A, *et al.* Effects of normoxic recovery on intima-media thickness of aorta and pulmonary artery following intermittent hypoxia in mice. *Front Physiol* 2020; 11: 583735.
- 42 Tachikawa R, Hamada S, Azuma M, *et al.* Impact of obstructive sleep apnea on abdominal aortic diameters. *Am J Cardiol* 2014; 114: 618–623.

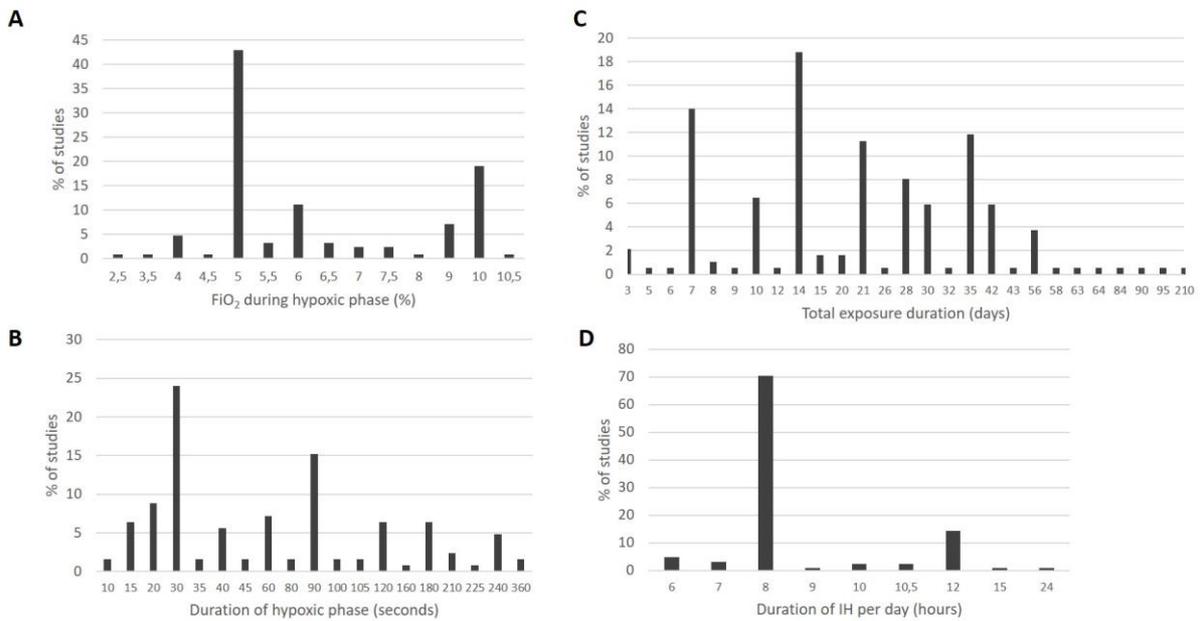
- 43 Kwon Y, Logan J, Redline S, *et al.* Obstructive sleep apnea and structural/functional properties of the thoracic ascending aorta: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Cardiology* 2019; 142: 180–188.
- 44 Castro-Grattoni AL, Alvarez-Buvé R, Torres M, *et al.* Intermittent hypoxia-induced cardiovascular remodeling is reversed by normoxia in a mouse model of sleep apnea. *Chest* 2016; 149: 1400–1408.
- 45 Rubies C, Dantas AP, Battle M, *et al.* Aortic remodelling induced by obstructive apneas is normalized with mesenchymal stem cells infusion. *Sci Rep* 2019; 9: 11443.
- 46 Phillips SA, Olson EB, Lombard JH, *et al.* Chronic intermittent hypoxia alters NE reactivity and mechanics of skeletal muscle resistance arteries. *J Appl Physiol* 2006; 100: 1117–1123.
- 47 Arnaud C, Bouyon S, Recoquillon S, *et al.* Nonmuscle myosin light chain kinase: a key player in intermittent hypoxia-induced vascular alterations. *J Am Heart Assoc* 2018; 7: e007893.
- 48 Zhao YY, Javaheri S, Wang R, *et al.* Associations between sleep apnea and subclinical carotid atherosclerosis: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Stroke* 2019; 50: 3340–3346.
- 49 Lévy P, Pépin J-L, Arnaud C, *et al.* Obstructive sleep apnea and atherosclerosis. *Prog Cardiovasc Dis* 2009; 51: 400–410.
- 50 Miller VM, Duckles SP. Vascular actions of estrogens: functional implications. *Pharmacol Rev* 2008; 60: 210–241.
- 51 Cano-Pumarega I, Barbé F, Esteban A, *et al.* Sleep apnea and hypertension: are there sex differences? The Vitoria Sleep Cohort. *Chest* 2017; 152: 742–750.
- 52 Page MJ, Sterne JAC, Higgins JPT, *et al.* Investigating and dealing with publication bias and other reporting biases in meta-analyses of health research: a review. *Res Synth Methods* 2020; 12: 248–259.

## Supplementary material

Supplementary Figure 1



**Figure supplémentaire S1 - Exemple d'Orchard Plot montrant la signification des différentes parties du diagramme.**



**Figure supplémentaire S2 - Description du nombre d'études incluses en fonction de quatre paramètres d'IH : A)  $FiO_2$  pendant la phase hypoxique (en %), B) durée de chaque phase hypoxique (en secondes), C) durée totale d'exposition (en jours), D) durée d'exposition à l'IH par jour (en heures).**

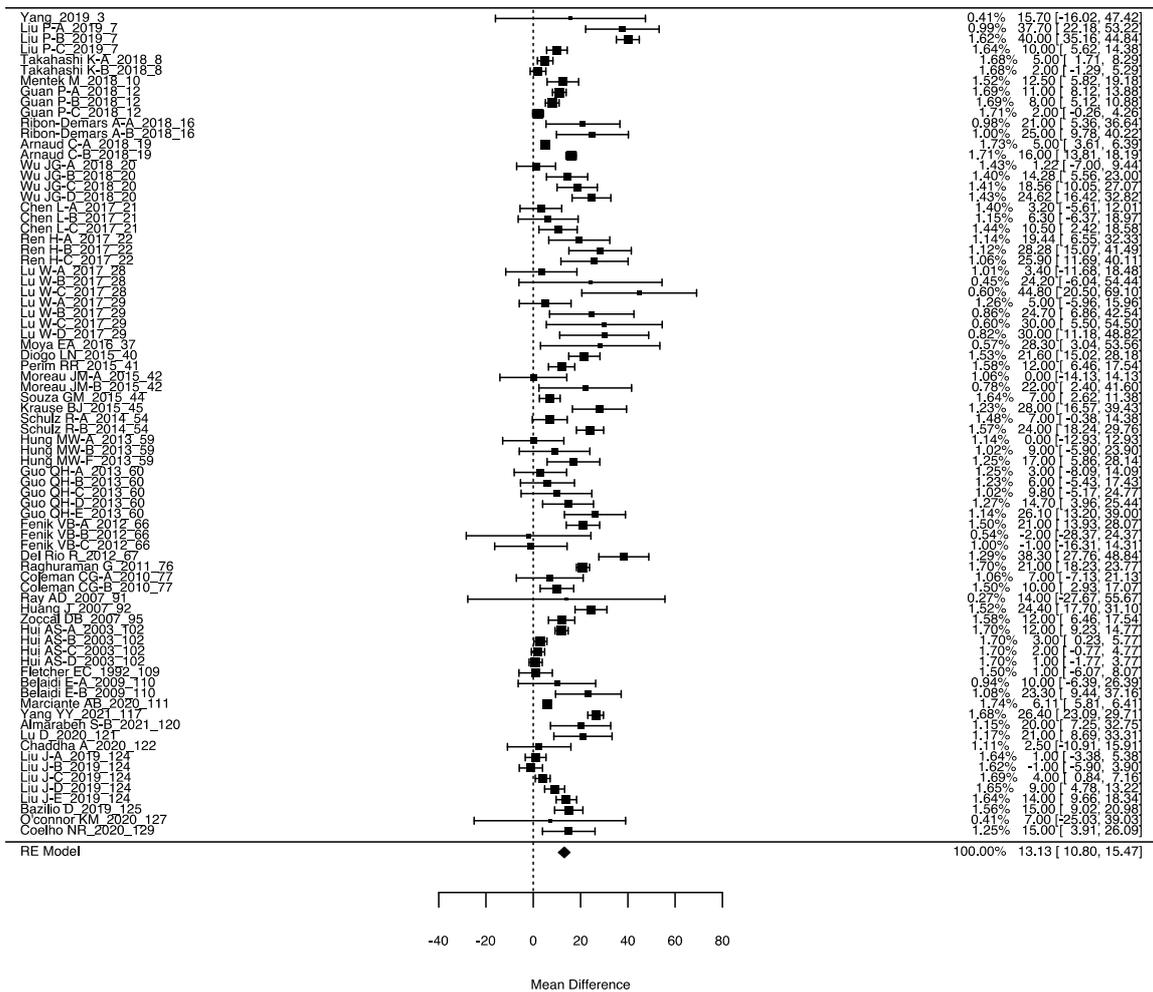


Figure supplémentaire S3A – Forest plot pour la pression sanguine systolique. Les différences moyennes sont exprimées en mmHg avec des intervalles de confiance à 95%.

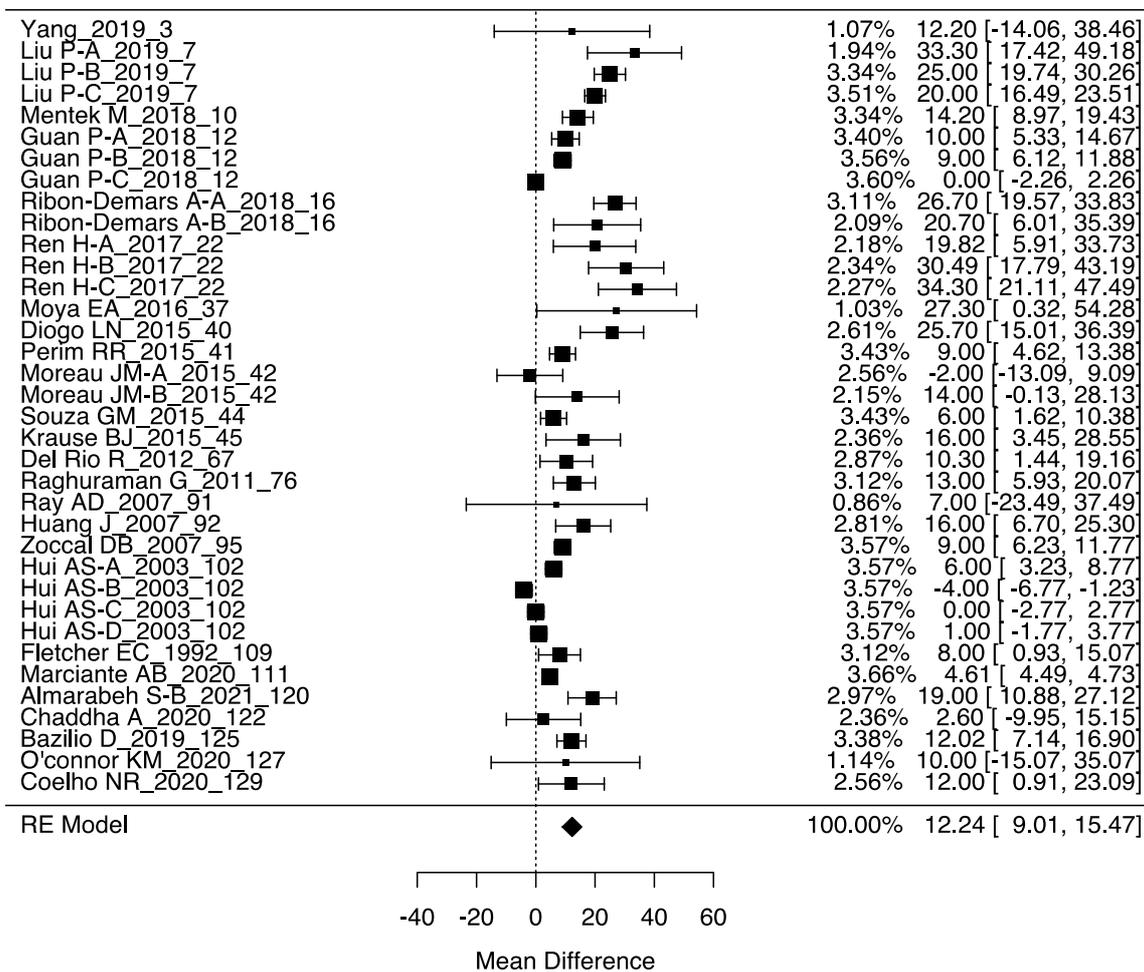
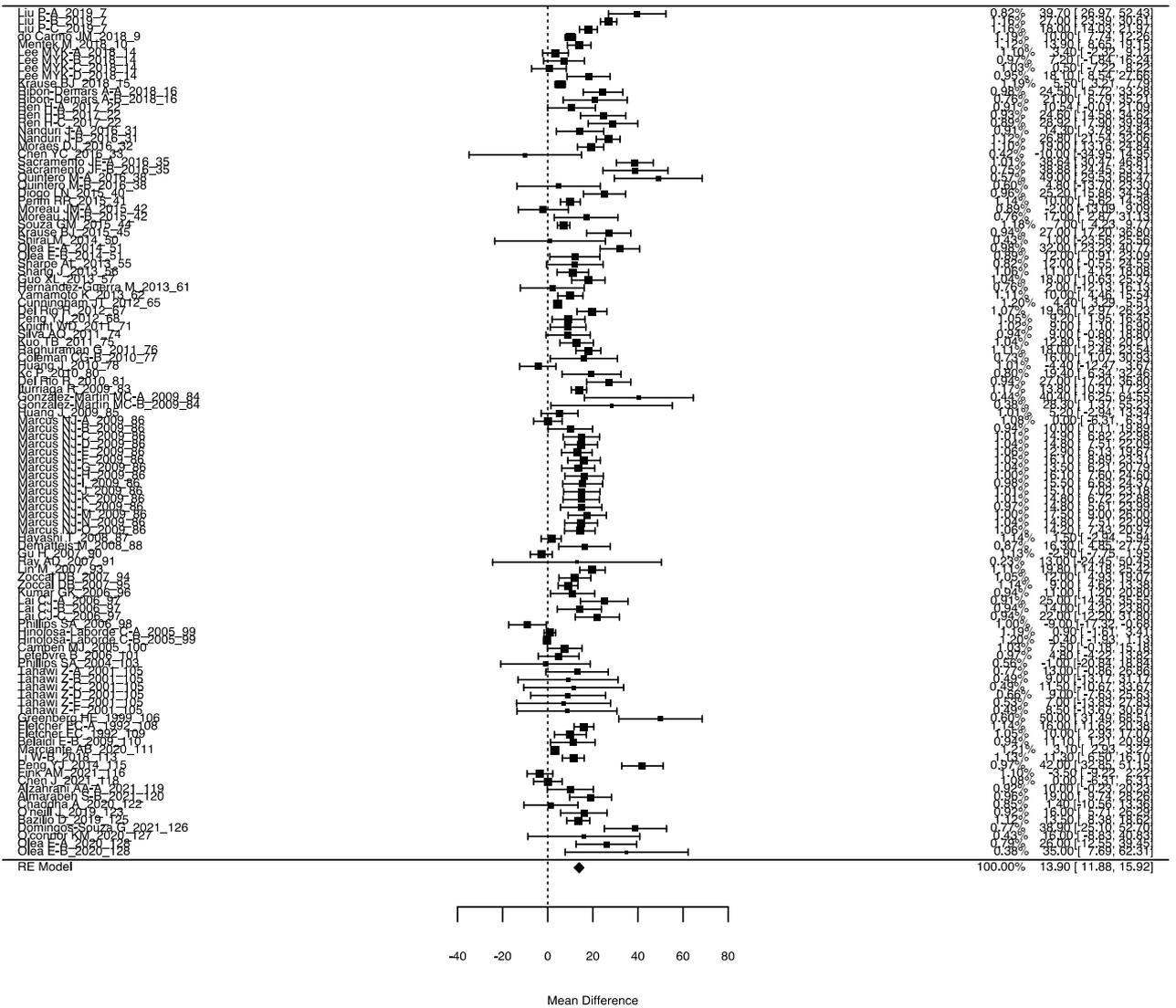


Figure supplémentaire S3B – Forest plot pour la pression sanguine diastolique. Les différences moyennes sont exprimées en mmHg avec des intervalles de confiance à 95%.



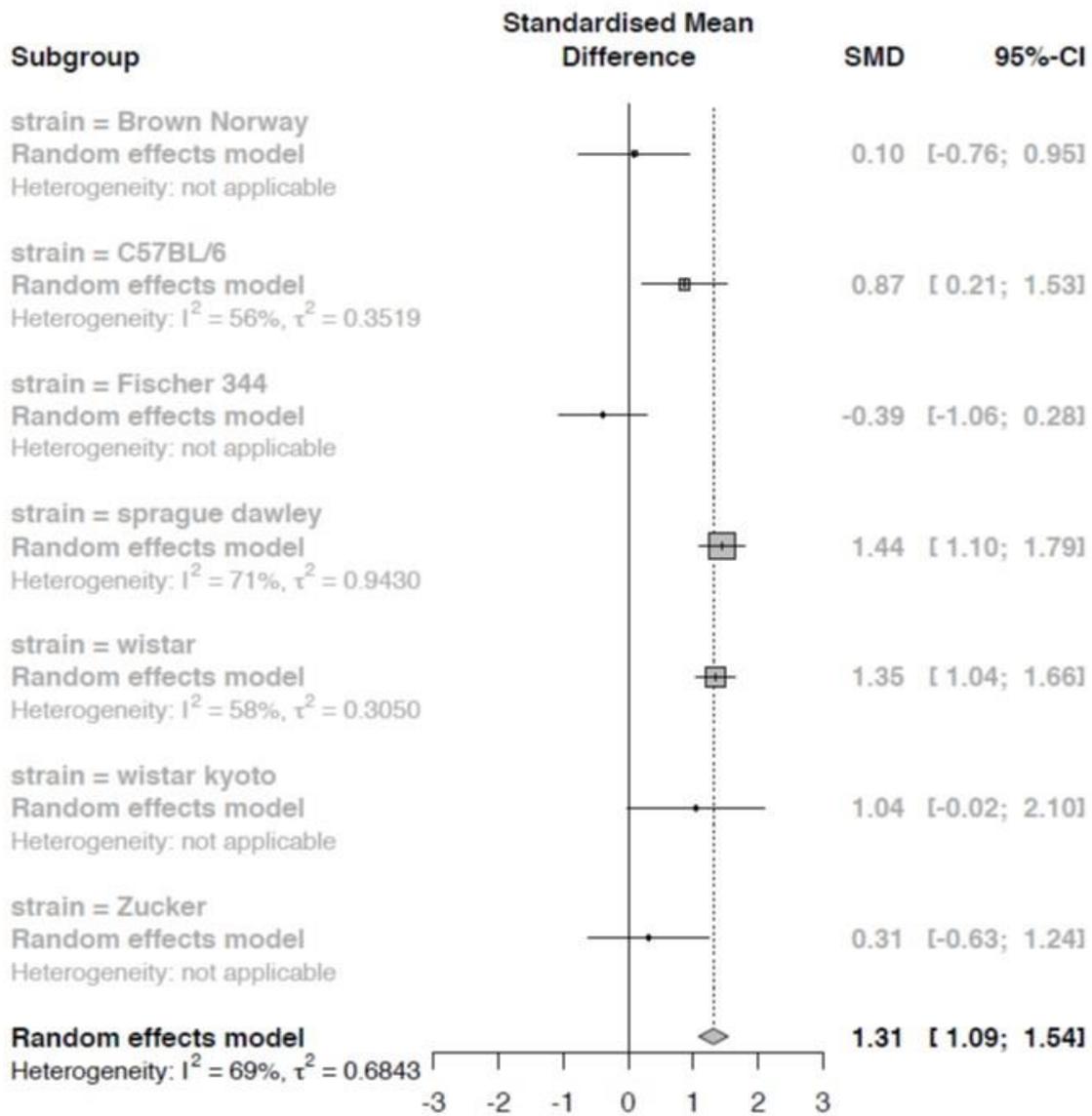


Figure supplémentaire S4 – Analyse des sous-groupes pour la PAM en fonction de la souche des animaux de type sauvage.  $p < 0,01$  pour les différences entre les sous-groupes.

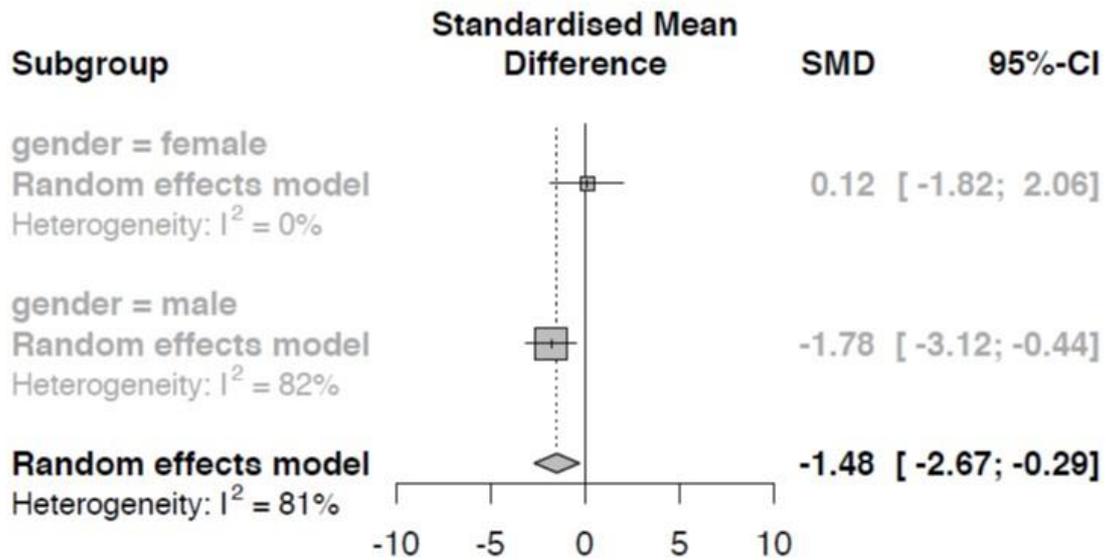


Figure supplémentaire S5 – Analyses de sous-groupes pour la dilatation des anneaux vasculaires en fonction du sexe des rongeurs.  $p < 0,01$  pour les femelles par rapport aux mâles.

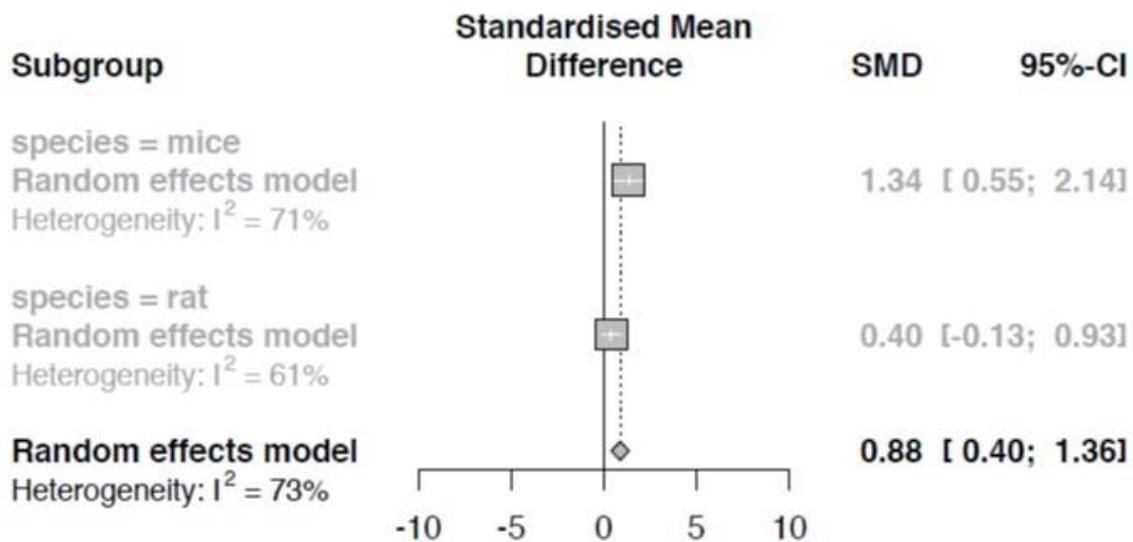
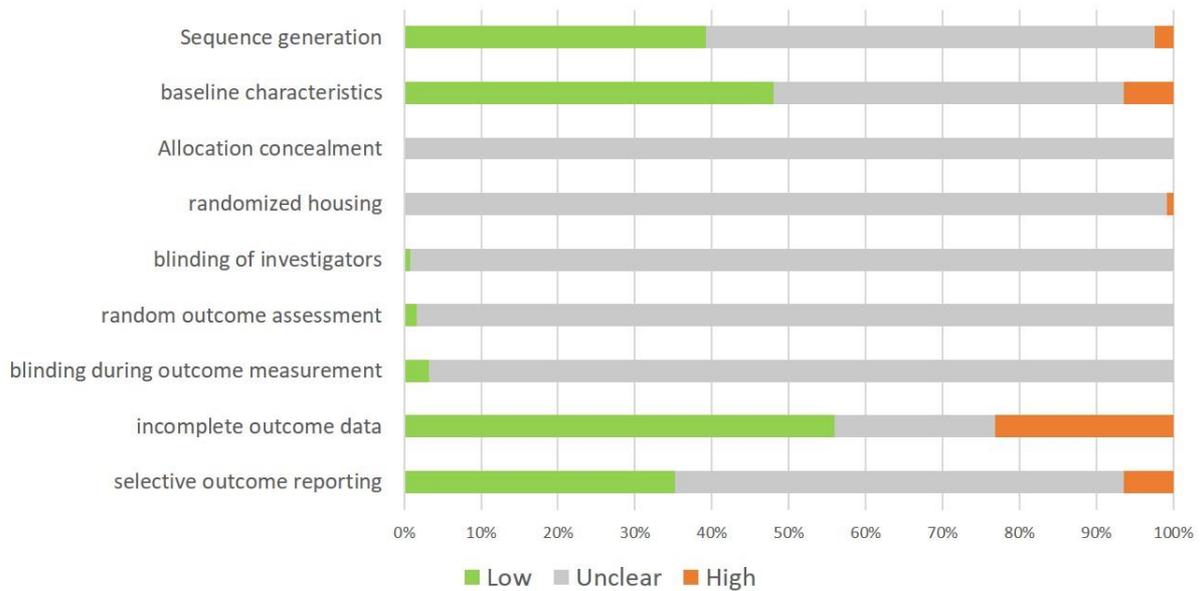
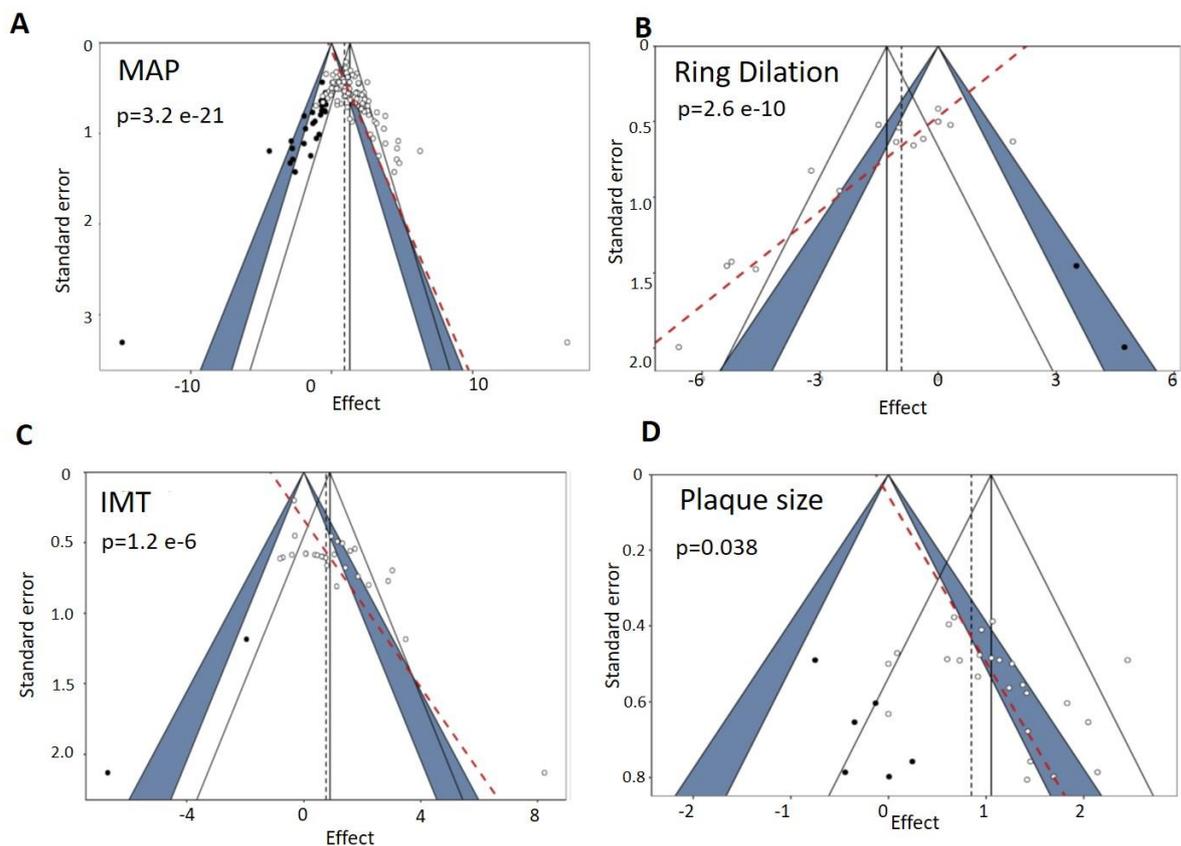


Figure supplémentaire S6 – Analyse des sous-groupes pour l'IMT selon l'espèce de rongeur.  $p = 0,05$  pour les souris par rapport aux rats.



**Figure supplémentaire S7 – Risque de biais des études évaluées avec l'outil SYRACLE. Pour chaque élément de l'outil SYRACLE, le pourcentage d'études présentant un risque de biais faible (vert) non clair (gris) ou élevé (orange) est indiqué.**



**Figure supplémentaire S8 - Diagrammes en entonnoir (Funnel plot) montrant un biais de publication pour les principaux résultats : (A) PAM, (B) dilatation d'anneau artériels, (C) IMT, (D) lésions d'athérosclérose chez les souris ApoE<sup>-/-</sup>.**

**Supplementary table S3.** Trim and fill analysis for correction of small study effect. The table indicates the corrected SMD, confidence interval and  $I^2$  after trim and fill analysis. All SMD remain significant after correction.

	Number of missing studies	Total number of studies	SMD	CI inf	CI sup	$I^2$
MAP	24	136	0.98	0.73	1.24	86%
RVD	0	16	-1.62	-2.71	-0.54	91%
IMT	0	28	0.94	0.51	1.37	77%
LESION	6	31	0.87	0.6	1.14	50%

**Table supplémentaire S3 – Analyse de l'ajustement et du remplissage pour la correction de l'effet des petites études**

## 5.2.2 Principaux résultats de l'article 3

### 5.2.2.1 Effet de l'hypoxie intermittente sur la réactivité vasculaire

Les différentes expérimentations ont été effectuées sur des artères canulées et/ou sur des anneaux d'artères montés sur un dispositif d'artériographie de tension.

L'hypoxie intermittente augmente la vasoconstriction artérielle induite par  $10^{-8}$ M d'endothéline-1 (SMD=1,11 [0,22 ; 2,01]). Cependant, aucun effet significatif n'a été démontré à  $10^{-6}$ M de phényléphrine (SMD=0,04 [-0,6 ; 0,68]).

L'hypoxie intermittente induit une diminution de la réponse à  $10^{-6}$  M d'Ach (SMD= -1,26 [-2,10 ; -0,41] pour les artères canulées, et SMD = -2,53 [-4,06 ; -1,00] pour les anneaux artériels). Cet effet est plus marqué chez les rongeurs mâles (SMD = -1,78 [-3,12 ; -0,44]) mais très faible chez les rongeurs femelles (SMD = 0,12 [-1,82 ; 2,06]).

### 5.2.2.2 Effet de l'hypoxie intermittente sur les pressions artérielles

L'hypoxie intermittente augmente significativement les pressions artérielles systolique, diastolique et moyenne. L'augmentation est en moyenne de l'ordre de 13 mmHg (SMD=1.43, CI [1.13-1.73]) pour la pression artérielle moyenne (PAM).

Les analyses de méta-régression sur les paramètres de l'hypoxie intermittente montrent qu'une FiO<sub>2</sub> plus sévère ainsi qu'une durée d'exposition plus longue a tendance ( $p=0,11$ ) à majorer l'effet de l'hypoxie intermittente sur la PAM.

### 5.2.2.3 Effet de l'hypoxie intermittente sur le remodelage vasculaire

L'hypoxie intermittente augmente significativement l'épaisseur intima-média de 5,23  $\mu$ m en moyenne (SMD = 1,10 [0,58 ; 1,62]).

Cet effet est dépendant de l'espèce et de l'âge avec une augmentation plus marquée chez la souris (SMD = 1,34 [0,55 ; 2,14]) que chez le rat (SMD = 0,40 [-0,13 ; 0,93]), et chez les rongeurs jeunes par rapport aux animaux âgés (association négative entre l'âge et l'épaisseur intima-média).

L'analyse de méta-régression multivariée montre une association positive significative entre l'augmentation de l'épaisseur intima-média et la durée totale d'exposition à l'hypoxie intermittente.

### 5.2.2.4 Effet de l'hypoxie intermittente sur les lésions d'athérosclérose

Cette partie de l'analyse concerne exclusivement les souris *ApoE*<sup>-/-</sup>, chez qui l'hypoxie intermittente augmente fortement la taille des lésions d'athérosclérose chez les souris *ApoE*<sup>-/-</sup> (SMD = 1,08 [0,80 ; 1,37]).

## 5.2.3 Discussion de l'article 3

Cette méta-analyse confirme l'effet délétère de l'hypoxie intermittente sur la structure et la fonction cardiovasculaire particulièrement concernant la dysfonction endothéliale, l'élévation de la pression artérielle, le remodelage vasculaire et l'athérosclérose. Ces résultats sont cohérents avec les effets du SAOS observés chez l'Homme et valident l'hypothèse du rôle majeur de l'HI sur l'apparition de troubles cardiovasculaires (Lévy et al. 2015a).

L'effet délétère de l'HI sur la vasorelaxation dépendante de l'endothélium sur modèle de rongeurs est cohérent avec les études cliniques suggérant que le SAOS est un

facteur de risque indépendant de dysfonction endothéliale et des troubles cardiovasculaires qui en découlent (Yuyu Wang et al. 2017; Bironneau et al. 2020). L'altération des capacités motrices vasoconstrictrices artérielles par l'HI est plus nuancée, avec un effet seulement en réponse à l'endothéline-1 et pas à la phényléphrine. Cela peut s'expliquer par la multitude de protocoles utilisés pour tester la réactivité artérielle, nous empêchant de comparer les effets d'une molécule et une concentration précise. De plus, bien que certaines études évoquent une différence de réponse en fonction du type de vaisseau, constatation que nous avons également pu faire dans nos expérimentations concernant l'étude de la SEP, nous n'avons pas pu comparer les différents impacts de l'HI entre les types de vaisseaux par manque de données présentes dans la littérature (Allahdadi, Walker, et Kanagy 2007).

Notre analyse montre que l'HI est associée, pour les modèles murins, à une augmentation significative de la PAM, ce qui est cohérent avec certaines études montrant l'augmentation de l'activité sympathique et de la pression artérielle observée chez des volontaires sains exposés à 14 nuits d'HI (R. Tamisier et al. 2011). L'augmentation de la PAM pourrait donc être liée à une augmentation de l'activité sympathique. Cependant, nous ne pouvons pas conclure sur une telle hypothèse, les expérimentations à ce sujet n'étant pas assez nombreuses pour analyser cette composante sur modèles murins. Toutefois, des études récentes menées dans notre laboratoire ont exploré cette question, et ces expérimentations démontrent que l'HI induit une augmentation de l'activité du système nerveux sympathique à visée cardiaque (Bourdier et al. 2020). De plus, une dénervation sympathique cardiospécifique sur des rats mâles Wistar exposés à 14 semaines d'hypoxie intermittente corrige l'aggravation de la fonction cardiaque causée par l'HI dans un modèle de cardiopathie ischémique (Detrait *et al.* données non encore publiées). Il est intéressant de noter que les analyses de méta-régression tendent à suggérer ( $p=0,11$ ) que la sévérité de l'hypoxie pourrait être un élément important dans le développement de l'hypertension liée au SAOS. D'un point de vue clinique, il pourrait donc être intéressant d'explorer cette piste et d'identifier si des paramètres tels que le temps passé en désaturation sanguine en oxygène ( $<90\%$ ) pourrait être plus pertinent pour définir la gravité du SAOS plutôt que l'actuel index d'apnée/hypopnée qui ne définit pas la charge hypoxique du patient.

Concernant l'effet de l'HI sur l'évolution de la taille des plaques athéromateuses (études exclusivement menées sur les souris ApoE<sup>-/-</sup>), cette étude montre un impact fort de l'HI favorisant les lésions d'athéroscléroses indépendamment du régime alimentaire. Cette observation est cohérente avec les études menées chez l'Homme (Lévy et al. 2015a; Drager et al. 2005).

Enfin, concernant le choix d'un protocole précis d'HI sur rongeur, qui serait reconnu comme plus représentatif de la situation des patients en clinique, aucun consensus ou aucun protocole privilégié n'a pu être identifié. En effet, malgré le fait que notre étude montre un effet robuste de l'HI sur les paramètres vasculaires analysés, ces effets sont indépendants de la durée d'exposition ou de la gravité de l'hypoxie intermittente. Toutefois, cette constatation est à nuancer puisque les critères de notre méta-analyse n'ont permis de sélectionner que des études dans lesquelles l'hypoxie intermittente est imposée sur plusieurs jours. De plus, il est apparu en analysant la littérature que l'amplitude de l'HI dans les études retenues était systématiquement sévère, avec une FiO<sub>2</sub> inférieure à 10% et de nombreux AHI, ce qui correspondrait chez l'Homme à un SAOS sévère. Cependant, l'ensemble des patients atteints de SAOS ne présentent

pas un stade aussi sévère de la pathologie. Dans ce contexte, il pourrait être très intéressant d'expérimenter chez l'animal l'effet d'une hypoxie légère à modérée ( $10\% < \text{FiO}_2 < 20\%$ ) et en suivant de façon plus précise l'évolution de la désaturation artérielle. De plus, l'un des éléments majeurs à prendre en compte dans le design d'une étude pré-clinique, plus que le protocole d'HI, sera le choix du modèle animal. En effet, il ressort de notre étude que les caractéristiques de l'animal impactent plus l'effet de l'hypoxie intermittente que les différents protocoles étudiés. En effet, le sexe de l'animal impacte la réponse vasomotrice des vaisseaux, les animaux mâles étant plus sensibles à l'effet de l'HI que les femelles. L'impact de l'HI sur la pression artérielle est supérieur chez les rats Sprague-Dawley et Wistar ainsi que chez les souris C57Bl/6 en comparaison des rats Fischer, Zucker ou Kyoto. Enfin, l'effet de l'HI sur le remodelage vasculaire est plus élevé chez la souris que chez le rat, mais également chez le sujet jeune plutôt qu'âgé. Cette dernière constatation pose également un problème dans la conception des études puisque les animaux utilisés sont majoritairement jeunes (8-9 semaines), ce qui correspond à des patients jeunes adultes, au mieux, alors que le SAOS est prédominant chez l'Homme à un âge bien plus avancé, autour des 50 ans et au-delà (Benjafield et al. 2019). Une autre problématique est la réalisation d'études beaucoup plus fréquemment sur des animaux mâles, par rapport aux femelles, alors que nous avons montré des divergences majeures liées au sexe. Enfin, le modèle animal reste, comme son nom l'indique, un modèle, et il pourrait être intéressant de se rapprocher au plus près de la pathologie humaine. En effet, des éléments comme la fragmentation du sommeil, l'augmentation des efforts respiratoires pendant les épisodes d'apnée ou encore l'hypercapnie sont des éléments à prendre en compte dans de futures expérimentations.

D'autres éléments permettant de se questionner sur la qualité des études et des protocoles pré-cliniques ont été mis en lumière dans cette méta-analyse. En effet, le risque de biais évalué par l'outil SYRCLE se révèle globalement assez élevé. Les funnels plots et les tests de régression d'Egger ont ainsi mis en évidence un effet des petites études (small study effect), ce qui signifie que les petites études (études comportant un faible nombre d'animaux) sont susceptibles de montrer un effet différent et/ou plus important que les études de plus grande ampleur. Ce small study effect pourrait être induit par des biais, notamment des biais de déclaration et des biais de publication, par des stratégies de recherche non-exhaustive ou encore par une mauvaise qualité méthodologique de ces études, induisant une grande hétérogénéité des résultats, une surestimation des résultats ou encore des conclusions liés au hasard plutôt qu'à la variable étudiée (Page et al. 2021). Il est intéressant de constater que de tels biais ne sont pas inhabituels concernant les études pré-cliniques et qu'ils sont quasi-systématiquement relevés dans les méta-analyses concernant les études sur modèles animaux. Ce biais de publication peut en partie être expliqué par la ligne de conduite de la plupart des journaux qui sont très réticents face à la publication de résultats négatifs et très sélectifs sur les résultats publiables. Il serait pourtant très intéressant de pouvoir publier des protocoles précis de recherche ainsi que certaines expérimentations n'ayant pas abouties à des résultats positifs, ce qui serait bénéfique pour l'ensemble de la communauté scientifique. Il pourrait également être intéressant dans les études sur modèles animaux de se rapprocher de la méthodologie de la recherche clinique et des directives SYRCLE qui prônent une plus grande rigueur et transparence dans les protocoles de recherche.

Toutefois, en ce qui concerne l'effet de l'hypoxie intermittente, il est intéressant de noter que les effets restent stables après les analyses de correction des valeurs

manquantes qui effacent artificiellement les biais de publication. Ce dernier résultat suggère donc un impact limité des petites études sur le résultat global.

Pour conclure, cette étude constitue la première revue systématique de la littérature évaluant l'effet global de l'hypoxie intermittente sur les paramètres vasculaires en pré-clinique sur des modèles de rongeurs. Certains effets de l'hypoxie intermittente ont ainsi pu être mis en évidence et/ou confirmés. Principalement le fait que l'HI, indépendamment des caractéristiques du protocole d'HI utilisé, induit :

- Une dysfonction endothéliale mise en évidence par une diminution de la vasodilatation en réponse à l'Ach,
- Une augmentation de la pression artérielle systolique, diastolique et moyenne
- Un remodelage vasculaire par augmentation de l'épaisseur intima-média
- Une augmentation de la taille des plaques d'athérome

De plus, l'analyse que nous avons réalisée s'est avérée plus exhaustive concernant l'impact de l'hypoxie intermittente sur la structure et la fonction vasculaires puisque certaines études présentaient des résultats concernant de la mécanique vasculaire. Ces résultats n'ont pas été publiés dans cette première méta-analyse car cela aurait complexifié le message. Toutefois, ces résultats feront l'objet d'une seconde méta-analyse dont l'objectif sera de décrypter et d'identifier les mécanismes physiopathologiques expliquant l'effet de l'hypoxie intermittente sur la structure et la fonction vasculaire. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus montrent une augmentation significative du stress oxydatif, de l'activation sympathique, de l'inflammation et de l'infiltration leucocytaire au niveau vasculaire en réponse à l'hypoxie intermittente. Cette seconde méta-analyse devrait être publiée dans les prochains mois.

Ce travail de méta-analyse sur les effets cardiovasculaires de l'HI sur modèles de rongeurs s'intègre dans un travail à plus grande échelle au sein de notre laboratoire puisqu'une autre méta-analyse a été réalisée et publiée sur les effets cardiaques de l'HI sur modèles de rongeurs (Belaidi et al. 2022). Cette étude a montré que les rongeurs exposés à l'HI présentent un remodelage cardiaque ainsi qu'une dysfonction contractile. De plus le protocole d'HI module l'effet de l'ischémie-reperfusion sur la taille de l'infarctus du myocarde.

Enfin, un travail intéressant de méta-recherche évaluant l'impact des réseaux d'auteurs sur la pression artérielle des souris exposées à l'hypoxie intermittente est actuellement soumis à publication. En effet, une forte hétérogénéité a été constatée dans les méta-analyses évaluant l'impact de l'hypoxie intermittente (IH) sur la pression artérielle moyenne (MAP) chez les rongeurs. Cette méta-recherche émet l'hypothèse que les conditions de laboratoire utilisées par les différents réseaux de co-auteurs, pourraient expliquer une part importante de cette hétérogénéité. L'ensemble des données rapportant un effet de l'HI sur la PAM des deux méta-analyses cardiovasculaires publiées par notre laboratoire ont ainsi été analysés (Belaidi et al. 2022; Harki, Boété et al. 2022). Des réseaux de co-auteurs ont été constitués en fonction des affiliations des auteurs des différents articles étudiés. L'impact de 12 réseaux identifiés a ensuite été étudié sur les données concernant la PAM des rongeurs exposés à l'hypoxie ou la normoxie. Les résultats de cette méta-recherche montrent que le réseau d'auteurs et l'environnement spécifique du laboratoire est un élément à prendre en compte concernant l'impact de l'HI dans les modèles de rongeurs. Les grandes différences entre les laboratoires ne sont pas entièrement expliquées par les détails du protocole d'exposition à l'HI décrit dans les articles, la

méthode de mesure de la pression artérielle ni par les caractéristiques du modèle de rongeur. Une part importante de cette hétérogénéité pourrait être liée à des conditions environnementales et protocolaires non rapportées, à l'appareillage de mesure de la pression artérielle ou à la plasticité phénotypique.

# Discussion générale

Cette thèse concernant l'« Étude de l'impact physiologique d'une protéine synthétique élastique dérivée de l'élastine comme signal moléculaire correcteur dans les artériopathies liées aux altérations des fibres élastiques » s'inscrit dans le cadre plus large du développement d'une protéine synthétique élastique (SEP) permettant de corriger les altérations des fibres élastiques vasculaires, soutenu par l'agence nationale de la recherche sous le nom de projet « Arterylastic » (ANR-18-CE18-0001).

Ce projet est motivé par l'incidence en santé publique de diverses pathologies artérielles liées à la dégradation des fibres élastiques (Fhayli, Boëté et al. 2019). Ces altérations peuvent être observées dans :

- Le vieillissement : avec le temps, la répétition de la contrainte sur la paroi artérielle associée à de nombreux mécanismes délétères vont altérer les fibres élastiques et provoquer en outre une diminution de l'élasticité ainsi qu'une augmentation de la rigidité artérielle (Fhayli, Boëté et al. 2019),
- Les maladies génétiques liées à l'élastogénèse incluant :
  - o Le syndrome de Williams-Beuren (SWB), pathologie génétique provoquée par la délétion d'une région entière sur le chromosome 7 (R. T. Collins et al. 2010; Kozel et al. 2014),
  - o Et la sténose aortique supra-valvulaire (SASV), induite par une déficience génétique hétérozygote du gène de l'élastine, se manifestant par un rétrécissement ou une obstruction de l'aorte ascendante (Ewart et al. 1993),
- Ainsi que dans des conditions pathologiques telles que l'hypoxie intermittente (HI) induite notamment par le syndrome d'apnée obstructive du sommeil (SAOS). Au cours de ce syndrome, une accélération de la dégradation physiologique des fibres élastiques a été observée (Arnaud, Beguin, et al. 2011).

Ces différentes affections sont causées, au moins en partie, par la dégradation des fibres élastiques artérielles et, conduisent par voie de conséquence à l'hypertrophie, la souffrance voire l'insuffisance cardiaque, couplée à une hémodynamique altérée, et induisant une mauvaise perfusion et une dysfonction d'organes. La réparation des fibres élastiques dégradées est donc un enjeu thérapeutique de première importance qui a fait l'objet de cette thèse. Nous avons étudié deux stratégies visant à restaurer les fibres élastiques altérées au cours de ces différentes pathologies.

Dans un premier temps, le but des expérimentations a été d'évaluer l'impact du traitement par la SEP injectée par voie sanguine : sa capacité à signaler dans les cellules vasculaires pour remodeler la paroi artérielle et/ou sa capacité à pénétrer dans

les parois artérielles et à s'intégrer dans les fibres élastiques altérées, et, *in fine*, à améliorer l'élasticité artérielle et la fonction cardiovasculaire. L'effet de la SEP a été évalué par la mesure de l'évolution, après traitement, des paramètres physiologiques des souris, de la structure artérielle, de la réactivité et du comportement mécanique de segments d'artères, ainsi que sur ses capacités à relancer la production de tropoélastine et plus généralement d'éléments impliqués dans la synthèse des fibres élastiques. L'objectif étant de restaurer (ou du moins d'améliorer) la fonction et les propriétés mécaniques de l'aorte de souris dans des conditions de dysfonctions vasculaires liées aux lésions des fibres élastiques, induites par :

- La déficience génétique en fibres élastiques,
- Le vieillissement,
- L'hypoxie intermittente,

Dans un second temps, j'ai pu collaborer d'un point de vue expérimental à la rédaction d'un article relatif à une étude visant à évaluer l'efficacité d'un alicament, l'aneth, avec le même objectif que pour la SEP, restaurer l'élasticité artérielle dégradée lors du vieillissement. Dans cette étude, nous avons comparé l'effet d'un traitement chronique (3 mois) par l'extrait d'aneth à 5% et 10% dans l'eau de boisson sur la structure et la fonction d'aortes ascendantes de souris mâles âgées de 24 mois.

## **1 Impact du traitement SEP et de l'extrait d'aneth sur la pression sanguine et le cœur**

Concernant la pression sanguine, trois jours après une injection unique intraveineuse de 12 µg/g de SEP, aucun changement de la pression sanguine n'a pu être détecté au cours de nos expérimentations concernant l'axe étudiant l'effet de la déficience génétique en élastine. Au vu des effets de diminution de la rigidité de la paroi artérielle (particulièrement pour les mâles *Eln<sup>+/-</sup>*) ainsi que de par les propriétés vasodilatatrices des EDPs démontrés *ex-vivo* par leur interaction avec l'ERC (G. Faury, Garnier, et al. 1998; G. Faury et al. 1994), un effet de diminution de la pression artérielle des animaux *Eln<sup>+/-</sup>* aurait pu être attendu. Il est probable qu'un tel effet soit observé dans le futur en modulant le protocole d'administration de la SEP, potentiellement en réponse à un traitement chronique.

Malheureusement, les données obtenues concernant l'effet de la SEP sur l'évolution de la pression artérielle des autres axes étudiés (vieillessement et hypoxie intermittente) sont non-exploitable (sphygmomanomètre) du fait d'une dysfonction de l'appareil de mesure. Des données de pression artérielle invasive ainsi que les données concernant l'évolution du poids des cœurs sur ces deux axes d'expérimentation sont en cours d'acquisitions et seront intégrées dans de futurs articles. Il sera intéressant d'analyser ces résultats, notamment la mesure de la pression artérielle au regard de la méta-analyse que nous avons réalisée qui indique l'induction d'une hypertension artérielle en réponse aux protocoles d'hypoxie intermittente (Harki et al. 2022). Il pourrait également être intéressant dans un futur proche de réaliser une étude chronologique de l'évolution des paramètres sanguins et en particulier de l'évolution de la pression artérielle des animaux suite à l'injection de

SEP par un suivi téléométrique qui permettrait d'avoir des données plus fiables et temporelles sur l'évolution de ces paramètres sur plusieurs semaines/mois. En effet, la téléométrie permet de supprimer certains biais imputables aux autres techniques de mesure de la pression artérielle, particulièrement l'effet stress induit par la sphymomanométrie et l'effet de l'anesthésie pour la mesure de pression artérielle invasive qui peut masquer des différences de pression de faible amplitude.

Par ailleurs, le traitement avec la SEP augmente légèrement le poids total du cœur et du ventricule gauche des mâles *Eln<sup>+/+</sup>* et *Eln<sup>+/-</sup>* âgés de 6 mois, mais pas des femelles. L'effet dépendant du sexe de la SEP sur le poids du cœur est cohérent avec des résultats précédents, montrant que :

- L'hypertrophie cardiaque est favorisée par la testostérone et inhibée par les œstrogènes (Chen et al. 2021)
- L'injection de peptides d'élastine se liant à l'ERC améliore de manière dépendante du NO (prouvé post-ischémie) le rapport fréquence cardiaque/pression sanguine (= travail cardiaque) chez les rats mâles (Robinet et al. 2007), qui est corrélé avec la masse du ventricule gauche (Azevedo et al. 1993).

L'augmentation modérée du poids du cœur observée chez les souris mâles *Eln<sup>+/+</sup>* et *Eln<sup>+/-</sup>* après le traitement par la SEP ressemble à l'hypertrophie cardiaque induite par le minoxidil, stimulateur de la production d'élastine, chez les rats et les souris mâles (Slove et al. 2013; Coquand-Gandit et al. 2017; W. Fhayli et al. 2019). Il faudra, dans les futures études, être attentif à ce potentiel effet secondaire similaire à celui retrouvé par un traitement avec le minoxidil, sachant que ce dernier peut, dans certains cas, provoquer des tamponnades chez certains patients (Oye, Oye, et Ali 2021). Toutefois, il est important de garder en tête que le protocole de nos expérimentations concerne une injection unique à haute dose de SEP, il pourrait être intéressant de réaliser un profil pharmacocinétique de la SEP et d'étudier si un autre protocole d'injection, cette fois chronique ou, à minima comportant plusieurs injections, et potentiellement à des doses individuelles plus basses, conserverait ses effets bénéfiques sur la mécanique et la réactivité artérielle et limiterait ce potentiel effet secondaire sur le cœur.

Il est intéressant de noter nos observations indiquant que le traitement chronique de souris C57Bl6/J mâles par de l'extrait d'aneth a conduit à une diminution de la pression artérielle et à une réversion de l'hypertrophie cardiaque liée à l'âge (Fhayli 2020 Biomolécules). Cependant, à l'instar de la SEP, le traitement par l'extrait d'aneth montre une différence d'effets en fonction des sexes. En effet, la réversion de l'hypertrophie cardiaque liée à l'âge n'est observée que chez les mâles et non les femelles (données du laboratoire non publiées). Une hypothèse probable serait l'implication de mTOR (enzyme de la famille des sérine/thréonine kinases qui régule la prolifération cellulaire, la croissance cellulaire, la mobilité cellulaire, la survie cellulaire, la biosynthèse des protéines et la transcription) dans le processus d'hypertrophie cardiaque. En effet, une étude a montré que l'activation de mTOR chez des souris mâles induit une hypertrophie ventriculaire tandis que la même activation chez les femelles est un protecteur cardiaque (Gürgen et al. 2013). Or, le traitement *in vitro* par la quercétine (polyphénol présent en grande quantité dans l'aneth) (Möhle, Heller, et Wellmann 1985) inhibe la signalisation de mTOR dans des cellules cancéreuses (Bruning 2013). Ainsi, l'aneth *via* la quercétine et mTOR pourrait

provoquer une réduction significative de la masse des ventricules cardiaques seulement chez les souris mâles.

## 2 Impact du traitement SEP et de l'extrait d'aneth sur la structure et la mécanique aortique

*In vivo*, le traitement par la SEP augmente l'épaisseur des lames élastiques dans les aortes des animaux mâles, et non des femelles, des deux génotypes. Ceci, ajouté à l'augmentation de la production d'élastine induite par la SEP *in vitro* par les CMLVs, en particulier celles des souris *Eln*<sup>+/-</sup> mâles, et les transcriptions de *fibrilline-1* dans le tissu aortique, suggère que cet épaississement des lames élastiques pourrait être dû à une néosynthèse de fibres élastiques, potentiellement accompagnée par l'intégration directe de la SEP dans les lames élastiques (mais ce dernier point n'a pas pu être démontré, voir chapitre 6 de la discussion générale). Les deux hypothèses sont cohérentes avec les résultats des études mécaniques de l'aorte ascendante, qui montrent que la rigidité accrue des aortes *Eln*<sup>+/-</sup> est réduite par la SEP, et se rapproche de la rigidité de l'aorte des animaux *Eln*<sup>+/+</sup>. Dans les expériences d'artériographie de pression, une réduction de la rigidité aortique induite par la SEP est également observée chez tous les animaux âgés de 6 mois, bien que cet effet soit de plus grande amplitude chez les souris *Eln*<sup>+/-</sup>, en particulier chez les mâles. Il est intéressant de noter que l'on retrouve cette diminution de la rigidité aortique induite par la SEP chez les animaux mâles âgés de 24 mois génétiquement déficients pour l'élastine (*Eln*<sup>+/-</sup>) sans effets sur les femelles ou les animaux témoins. De plus, aucun effet de la SEP n'a été constaté pour les animaux C57Bl/6J âgés de 24 mois des deux sexes. Il apparaît donc que la SEP semble être plus efficace chez les mâles que chez les femelles et chez les jeunes individus plutôt que les individus âgés. La quantité plutôt que la qualité de l'élastine semble également avoir un rôle puisque chez les individus âgés la SEP n'a d'effets que chez les mâles *Eln*<sup>+/-</sup> quand, chez les individus de 6 mois, la SEP induit une réduction de la rigidité aortique chez tous les animaux. Ainsi les effets de la SEP semblent impliquer un mécanisme biologique qui se dégrade avec l'âge. Cet effet est de plus grande amplitude lorsque la quantité d'élastine est diminuée (déficience génétique en élastine). Il est toutefois intéressant de noter que, de façon similaire, une diminution de la rigidité artérielle est observée chez les animaux exposés à l'hypoxie intermittente mais cette fois unique chez les femelles sans effets pour les mâles.

La SEP augmente les diamètres internes et externes de l'aorte ascendante chez les souris *Eln*<sup>+/+</sup> seulement, de façon intéressante, on retrouve cette augmentation des diamètres internes et externes après injection à la SEP chez les animaux âgés *Eln*<sup>+/+</sup> mâles uniquement, ce qui indiquerait que les mêmes mécanismes sont en place chez ces animaux génétiquement déficients en élastine. Aucune observation de la sorte n'est observée chez les mâles exposés à l'hypoxie intermittente ou chez les mâles C57Bl/6J âgés pour lesquels la SEP ne semble pas avoir d'influence sur ces paramètres bien que la SEP provoque un épaississement de la paroi chez les mâles C57Bl/6J âgés uniquement. Ces données pourraient indiquer un dépôt de SEP et/ou de tropoélastine néosynthétisée dans la paroi des vaisseaux des animaux. Ce

mécanisme retrouvé essentiellement chez les mâles pourrait être corrélé à la présence d'hormones sexuelles masculines comme la testostérone.

Alors que les lames élastiques des animaux *Eln*<sup>+/-</sup> présentent beaucoup plus de ruptures que celles des souris *Eln*<sup>+/+</sup>, une forte tendance à l'abolition de cette différence est observée après le traitement par la SEP. Par conséquent, cela suggère également un potentiel de la SEP pour réparer les fibres élastiques préexistantes, ce qui ressemble à l'effet protecteur/restauratif déjà démontré, sur les fibres élastiques vieillissantes du minoxidil et de l'extrait d'aneth (Knutson et al. 2018; Coquand-Gandit et al. 2017; W. Fhayli et al. 2019; Fhayli, Boëté et al. 2020). Cet effet pourrait également contribuer à l'amélioration des propriétés mécaniques de l'aorte induite par la SEP chez les souris *Eln*<sup>+/-</sup> mâles. Cela sera à confirmer par les analyses histologiques des autres groupes.

*In vitro*, la SEP stimule la production d'élastine par les CMLVs aortiques en culture provenant de souris *Eln*<sup>+/+</sup> et *Eln*<sup>+/-</sup> mâles et femelles, bien qu'avec une amplitude substantiellement plus élevée chez les animaux *Eln*<sup>+/-</sup> mâles. Il est à noter que, de façon similaire, un effet stimulateur de l'extrait d'aneth sur la production d'élastine par les CMLVs aortiques de souris mâles C57Bl6/J âgés a aussi été observé. La SEP augmente également la prolifération des CMLVs au cours des trois premiers jours suivant le traitement, alors qu'elle a tendance à diminuer la prolifération cellulaire au sixième jour après le traitement. Ces résultats sont cohérents avec d'autres études montrant une diminution de la prolifération de CMLVs en culture induite par l'ajout d'EDPs dans le milieu (Karnik, Brooke, et al. 2003). Les études des effets de la SEP *in vitro et ex vivo* sur les artères sont à l'heure actuelle limitées à l'axe concernant la déficience génétique en élastine, mais montrent un potentiel très intéressant qu'il faudra confirmer par l'étude des autres groupes d'animaux, vieillissant ou soumis à une hypoxie intermittente.

Les analyses complémentaires d'histologie et d'analyse de l'expression des ARNm des autres groupes qui feront l'objet de prochains articles seront très intéressantes à comparer avec les résultats obtenus jusqu'à présent chez les souris déficientes en élastine. De plus, nous avons également récolté des données sur d'autres vaisseaux dans l'ensemble des axes étudiés, ce qui nous donnera un regard plus global sur les effets de la SEP dans l'ensemble du réseau cardiovasculaire. En effet, nous avons effectué les mêmes expérimentations d'artériographie de pression sur l'artère fémorale (une artère musculaire) et sur l'artère pulmonaire gauche des différents animaux. Les analyses de ces vaisseaux pourraient confirmer l'hypothèse selon laquelle la diminution de la quantité d'élastine le long de l'arbre vasculaire favorise les effets de la SEP, comme pourrait le suggérer l'effet que nous avons observé chez les animaux *Eln*<sup>+/-</sup>. En effet, l'aorte ascendante étant un vaisseau élastique riche en fibres élastiques, l'ajout d'une petite quantité de SEP et/ou d'élastine néosynthétisée induit un changement de la structure-fonction relatif plus faible que la même quantité de SEP et/ou d'élastine néosynthétisée ajoutée à un vaisseau moins riche en fibres élastiques.

Enfin, il pourrait être intéressant d'étudier l'effet de la SEP sur l'expression des différents ARNm à des temporalités différentes, notamment de façon précoce après l'injection de SEP. Les observations que nous avons réalisées ayant été effectuées 3 jours après l'injection de SEP, il est possible que certaines variations ou mécanismes précoces n'aient pas pu être identifiés.

### 3 Mécanismes d'action de la SEP et de l'extrait d'aneth sur la structure-mécanique aortique

Afin de comprendre les mécanismes conduisant la SEP à améliorer l'élasticité de l'aorte, nous avons étudié la production tissulaire d'ARNm liés aux fibres élastiques ou de collagène, et mesuré le niveau tissulaire de trois des principales protéines impliquées dans la synthèse des fibres élastiques, c'est-à-dire la tropoélastine (TE), la fibrilline-1 (FBN1) et la lysyl oxydase (LOX). Trois jours après son administration, le traitement avec la SEP diminue significativement le niveau d'expression de l'ARNm des segments d'aortes de la *Lox* chez les souris femelles, et non chez les souris mâles *Eln<sup>+/+</sup>* et *Eln<sup>+/-</sup>*. Cet effet, observé au jour 3 après l'injection de SEP, est cohérent avec l'absence d'épaississement des lames élastiques chez les animaux femelles et est concomitant à l'augmentation de la teneur en protéines *LOX* au même moment, cette dernière pouvant résulter d'un pic de production de protéines plus précoce. De plus, la production de fibrilline-1 est globalement augmentée par la SEP dans l'aorte ascendante, indépendamment du sexe ou du génotype des souris, favorisant l'impact positif de la SEP sur la néosynthèse des fibres élastiques. Il sera intéressant de confirmer ces effets de la SEP lors des analyses des différents axes, et une étude temporelle de l'évolution des niveaux d'ARNm liés aux fibres élastiques ou de collagène à la suite de l'injection de SEP serait également pertinente.

Les spécificités des CMLVs aortiques de la souris *Eln<sup>+/-</sup>* pourraient également être impliquées dans la modulation des fonctions artérielles ou cellulaires produites par la SEP, puisque la SEP induit des effets différentiels chez les souris *Eln<sup>+/+</sup>* et *Eln<sup>+/-</sup>* concernant la réactivité, ainsi que les fonctions prolifératives et synthétiques des CMLVs. Il a déjà été démontré que les CMLVs des souris *Eln<sup>+/-</sup>* et *Eln<sup>+/+</sup>* ne produisent pas (*Eln<sup>-/-</sup>*) ou moins (*Eln<sup>+/-</sup>*) d'élastine (Mylène Pezet et al. 2008b; D. Y. Li, Faury, et al. 1998; Gilles Faury et al. 2003) et hyperprolifèrent spontanément, par rapport aux CMLVs des animaux *Eln<sup>+/+</sup>*. Les CMLVs *Eln<sup>+/-</sup>* reviennent à un taux de croissance normal après l'ajout de tropoélastine, et la prolifération des CMLVs *Eln<sup>+/+</sup>*, *Eln<sup>+/-</sup>* et *Eln<sup>-/-</sup>* est fortement réduite par la rapamycine, un inhibiteur antiprolifératif de mTOR (Karnik, Brooke, et al. 2003; W. Li et al. 2013). Nous avons montré que la SEP est capable de stimuler la prolifération des CMLVs en culture chez les souris *Eln<sup>+/+</sup>* rapidement après l'administration du traitement (jour 1), et de l'inhiber ensuite (jours 3-6) chez les souris *Eln<sup>+/+</sup>* des deux sexes et les animaux *Eln<sup>+/-</sup>* mâles. La SEP stimule également la synthèse d'élastine par les CMLVs à différents moments et à différentes concentrations de SEP, selon le groupe d'animaux, mais surtout chez les souris *Eln<sup>+/-</sup>* mâles qui est le groupe dans lequel la SEP améliore le plus la rigidité artérielle. L'inhibition à long terme (jours 3-6) de la prolifération des CMLVs par la SEP ressemble à l'inhibition de la croissance des CMLVs de souris déficientes en élastine par la tropoélastine, démontrée précédemment, trois jours après le traitement (Karnik, Brooke, et al. 2003). Il est également important de noter que, globalement, pour un groupe de souris de sexe et de génotype donné, les temps et les concentrations de SEP pour lesquels une surproduction d'élastine est observée sont ceux pour lesquels la SEP n'a pas induit d'effet sur la prolifération. Ceci est cohérent avec des

observations précédentes montrant, dans des CMLVs de poussins, un effet inverse des peptides d'élastine sur la prolifération (augmentation) et la production d'élastine (diminution), probablement due à la régulation de la production d'élastine pendant la croissance cellulaire (H. Wachi et al. 1995). Notre étude suggère que cet effet pourrait être provoqué par la liaison des peptides d'élastine au récepteur d'élastine (ERC). Les résultats rapportés ici pourraient être liés au même mécanisme puisque la SEP comprend des séquences de liaison à l'ERC (brevet #WO2017194761, (DEBRET et al. 2017)) (G. Faury 1998; Le Page et al. 2019; Wahart et al. 2019). La SEP étant conçue pour contenir les mêmes sites de liaison que la tropoélastine concernant le complexe récepteur de l'élastine (ERC) et l'intégrine  $\alpha\beta_3$ , il est donc probable qu'un ou ces deux récepteurs soient impliqués dans le mécanisme d'action de la SEP. Il sera très intéressant d'étudier et de confirmer ces effets de la SEP chez les animaux âgés et/ou ayant subi une hypoxie intermittente, particulièrement dans les groupes montrant un impact de la SEP sur la mécanique artérielle, par exemple les femelles exposées à l'hypoxie intermittente.

Il est particulièrement intéressant de noter que le traitement par la SEP modifie également la conformation des fibres de collagène aortiques chez les souris femelles, et pas chez les mâles. Chez les animaux *Eln*<sup>+/+</sup> femelles, l'injection de SEP augmente la longueur des fibres de collagène (dans la média) et la rectitude (dans la paroi entière), atteignant les valeurs de rectitude plus élevée trouvées chez les souris *Eln*<sup>+/+</sup> mâles. Dans la média de l'aorte des souris *Eln*<sup>+/-</sup> femelles, le traitement par la SEP diminue la longueur des fibres de collagène. Il sera donc intéressant d'étudier ultérieurement la conformation des fibres de collagène chez les femelles exposées à l'hypoxie intermittente afin de confirmer cet effet, car cela pourrait potentiellement expliquer la diminution de la rigidité artérielle induite par la SEP observée aux hautes pressions dans ce groupe d'animaux. En parallèle, le traitement SEP induit une tendance forte à l'augmentation des niveaux d'expression de l'ARNm de *Col1a1* chez les souris *Eln*<sup>+/-</sup> mâles et une diminution significative du niveau d'expression de l'ARNm de *Col3a1* chez tous animaux. Ces modifications de la distribution des types de collagène induites par la SEP pourraient également expliquer les changements structuraux et mécaniques observés dans l'aorte ascendante. Cette hypothèse est étayée par certains résultats de la littérature :

- 1) les changements du rapport collagène de type I/type III et de la longueur des fibres de collagène sont en corrélation avec le passage d'un état normal à un état pathologique dans les tissus, comme cela a été démontré dans le cœur (Sahu et al. 2020),
- 2) le rapport synthèse/dégradation du collagène de type I est en corrélation négative avec la rigidité artérielle (McNulty et al. 2006), ce qui suggère qu'une augmentation de l'expression du collagène de type I pourrait contribuer à diminuer la rigidité aortique chez les animaux *Eln*<sup>+/-</sup> mâles jeunes et âgés

Ceci doit être mis en perspective avec l'impact du traitement SEP sur les propriétés mécaniques et morphologiques de l'aorte observées chez les animaux *Eln*<sup>+/-</sup>. Chez les souris *Eln*<sup>+/+</sup>, l'augmentation de la longueur et de la rectitude des fibres de collagène induite par la SEP s'est produite uniquement chez les femelles et, par conséquent, ne peut pas expliquer les augmentations des diamètres externe et interne observées pour les deux sexes après le traitement par la SEP. Cependant, chez les souris *Eln*<sup>+/-</sup> femelles, la diminution de rigidité artérielle induite par la SEP est plus faible que chez

les mâles, ce qui pourrait aussi être partiellement due à la diminution de la longueur des fibres de collagène induite par la SEP, détectée uniquement chez les souris *Eln*<sup>+/-</sup> femelles et pas chez les mâles.

Il serait enfin intéressant d'approfondir la recherche sur les mécanismes d'action des effets de la SEP afin de proposer un protocole optimal d'utilisation. Il est probable que des études de pharmacocinétique nous permettent d'ajuster le protocole d'administration de la SEP afin d'obtenir des effets sur la structure-fonction aortique, notamment les animaux âgés. De façon intéressante, les études sur l'extrait d'aneth nous montrent qu'il faut du temps pour rétablir les caractéristiques mécaniques cardiaques particulièrement pour les animaux âgés pour lesquels les processus biologiques sont altérés (Fhayli, Boëté et al. 2019). En effet, comme la SEP, l'extrait d'aneth à 10% induit une augmentation de la quantité d'ARNm de tropoélastine et de *Loxl-1* (deux contributeurs majeurs de la synthèse et de l'assemblage des fibres élastiques) ainsi qu'une augmentation de la production d'élastine produite *in vitro* par les CMLVs. Cependant, là où une injection unique de SEP ne parvient pas à restaurer les caractéristiques fonctionnelles de l'aorte ascendante d'animaux âgés, un traitement chronique de 3 mois par l'extrait d'aneth à 10% provoque un abaissement du module incrémental d'élasticité reflet de la rigidité artérielle et une augmentation de la distensibilité aortique des animaux mâles âgés, ce qui permet l'inversion de l'hypertrophie cardiaque liée à l'âge observée chez les animaux non traités. Il est possible qu'un traitement chronique ou multi-injections avec la SEP puisse induire de tels effets chez les animaux âgés.

## 4 Impact du traitement SEP sur la réactivité aortique

Outre son impact différentiel, selon le génotype, sur la prolifération des CMLVs et la production d'élastine, la SEP agit également d'une manière dépendante du génotype et du sexe sur la réactivité artérielle.

Le traitement par la SEP augmente la réponse contractile de l'aorte ascendante à la phényléphrine (Phe,  $\geq 10^{-7}$  M) chez les animaux femelles des deux génotypes et chez les souris *Eln*<sup>+/+</sup> mâles uniquement. L'augmentation de la constriction aortique induite par la Phe après traitement par la SEP dans ces groupes pourrait être liée aux séquences d'acides aminés de la SEP similaires aux sites de liaison pour l'ERC, présent à la membrane des CMLVs (G. Faury 1998). Certaines études ont démontré que l'application de tropoélastine sur des CMLVs *Eln*<sup>+/-</sup> en culture favorise le phénotype contractile de ces cellules en induisant la formation de fibres d'actine organisées, par l'intermédiaire de la séquence de tropoélastine VGVAPG connue pour se lier à l'ERC (Karnik, Brooke, et al. 2003; Karnik, Wythe, et al. 2003). Ce phénomène pourrait en outre être renforcé chez les animaux *Eln*<sup>+/-</sup>, ici chez les femelles, qui subissent un stress circonférentiel aortique sensiblement plus faible, puisque les CMLVs sont connues pour être des capteurs mécaniques médiés par les intégrines dans la paroi artérielle et régissent l'organisation du réseau d'actine, c'est-à-dire la capacité contractile, en fonction de l'étirement de la paroi (Yamashiro et Yanagisawa 2020).

De plus, le traitement par la SEP rétablit la réponse vasodilatatrice altérée des aortes des femelles *Eln*<sup>+/-</sup> à l'acétylcholine (Ach,  $\geq 10^{-8}$  M), caractérisant une dysfonction endothéliale chez ces animaux. L'altération de la réponse vasodilatatrice à l'Ach uniquement chez les souris *Eln*<sup>+/-</sup> femelles, pourrait être liée à une interaction entre le génotype et les hormones femelles. Cela est cohérent avec les résultats d'études précédentes qui ne montrent pas de réponse vasodilatatrice différentielle à l'Ach entre les aortes ascendantes des souris *Eln*<sup>+/+</sup> et *Eln*<sup>+/-</sup> mâles et un état d'hyperconstriction des artères rénales chez les souris *Eln*<sup>+/-</sup> femelles uniquement (Mylène Pezet et al. 2008b; Gilles Faury et al. 2003; Owens et al. 2017). Comme une réponse vasodilatatrice similaire au SNP (donneur de NO non dépendant de l'endothélium), agissant directement sur la relaxation des CMLVs, a été observée dans les quatre groupes d'animaux de l'axe déficience génétique en élastine, nous avons pu conclure qu'aucun groupe d'animaux ne présente une dysfonction des CMLVs, et qu'un dysfonctionnement endothélial explique la réponse plus faible de l'aorte ascendante des souris *Eln*<sup>+/-</sup> femelles au vasodilatateur NO-dépendant Ach. La restauration d'une réponse vasodilatatrice à l'Ach normale de ces animaux après le traitement avec la SEP pourrait être expliquée par l'action vasodilatatrice déjà démontrée des séquences d'élastine se liant à l'ERC puisque certaines de ces séquences, y compris VGVAPG, sont présentes dans la SEP (G. Faury et al. 1994; 1995; G. Faury, Garnier, et al. 1998; D. Y. Li, Brooke, et al. 1998).

Il sera intéressant d'étudier les effets de la SEP sur la réactivité aortique des autres axes étudiés, particulièrement concernant l'axe hypoxie intermittente puisque notre méta-analyse (Harki, Boëté et al. 2022) indique que l'hypoxie intermittente induit une diminution de la réponse à l'Ach, qui peut être assimilée à une dysfonction endothéliale, particulièrement chez les rongeurs mâles. L'étude de ce paramètre nous permettra de confirmer les capacités de la SEP à restaurer une dysfonction endothéliale comme c'est le cas pour les animaux *Eln*<sup>+/-</sup>.

Concernant les effets de la SEP sur la réactivité artérielle des animaux C57Bl/6J âgés, les premiers résultats suggèrent un effet très limité d'une injection unique de SEP sur ce groupe d'animaux (données non encore publiées).

## **5 Différences liées au sexe dans la réponse au traitement par la SEP**

Les réponses différentes des animaux mâles et femelles au traitement par la SEP sont particulièrement intéressantes. La SEP induit une augmentation de la prolifération initiale des CMLVs des souris *Eln*<sup>+/+</sup> des deux sexes. Cependant, le traitement SEP induit une réduction plus tardive de la prolifération des CMLVs chez les femelles seulement, alors que pratiquement aucune différence liée au sexe n'a pu être détectée chez les animaux *Eln*<sup>+/-</sup>. De plus, comparée aux effets observés chez les animaux femelles, la SEP augmente de manière substantielle la production d'élastine par les CMLVs d'animaux mâles *Eln*<sup>+/-</sup> et induit un épaississement des lames élastiques chez les mâles, indépendamment du génotype. Ceci est particulièrement important, car la diminution de la rigidité aortique induite par la SEP est de plus grande amplitude chez les souris mâles par rapport aux femelles. Cette différence biomécanique est

probablement aussi liée aux autres changements structurels induits par la SEP observés chez les femelles, et non chez les mâles, au jour 3 après le traitement. Cela comprend : une diminution du niveau des ARNm de *Lox* et une augmentation des niveaux de protéine LOX (indépendamment du génotype), ainsi qu'une augmentation de la rectitude et de la longueur des fibres de collagène chez les souris *Eln<sup>+/+</sup>* et une diminution de la longueur des fibres de collagène chez les animaux *Eln<sup>+/-</sup>*. De façon surprenante, chez les souris *Eln<sup>+/-</sup>*, la SEP augmente également la vasoconstriction induite par la Phe et la vasodilatation induite par l'Ach chez les femelles seulement, à la seule exception d'une vasodilatation améliorée chez les animaux *Eln<sup>+/-</sup>* mâles à 10-7M Ach.

De telles différences liées au sexe dans la réponse au traitement SEP ne sont pas surprenantes puisque, comme évoqué précédemment, il a été démontré que les hormones sexuelles interfèrent avec plusieurs mécanismes physiopathologiques, tels que l'hypertrophie cardiaque, qui est favorisée par l'hormone mâle testostérone et inhibée par l'hormone femelle œstrogène (Chen et al. 2021). De plus, une étude récente de Hawes et collaborateurs confirme que les hommes et les femmes suivent des cinétiques de remodelage cardiovasculaire différents avec le vieillissement et sont affectés de manière différente par la réduction du contenu en élastine (Hawes et al. 2020).

Ces différences liées au sexe en réponse à un agent pharmacologique ne sont pas rares. Par exemple, l'impact différentiel en fonction du sexe du traitement pharmacologique avec le minoxidil sur la structure-fonction des artères a également été démontré chez la souris. Dans l'aorte abdominale, le minoxidil augmente le contenu en élastine et en collagène, diminue la rigidité chez les femelles, mais pas chez les mâles, et augmente le diamètre interne chez les mâles, mais pas chez les femelles (W. Fhayli et al. 2019). De plus, comme nous l'avons vu, à l'instar de la SEP, le traitement par l'extrait d'aneth agit différemment en fonction du sexe.

Ces différences liées au sexe ont également été confirmées par l'étude des autres axes au cours de cette thèse avec des effets différentiels selon le sexe dans pratiquement tous les groupes étudiés. Par conséquent, les investigations futures feront sans doute apparaître des effets différentiels de la SEP chez les mâles et les femelles, ce qui peut être important pour anticiper l'adaptation précise d'éventuels traitements futurs au sexe de l'animal ou du patient.

## **6 Questionnements sur la présence de SEP dans la paroi de l'aorte**

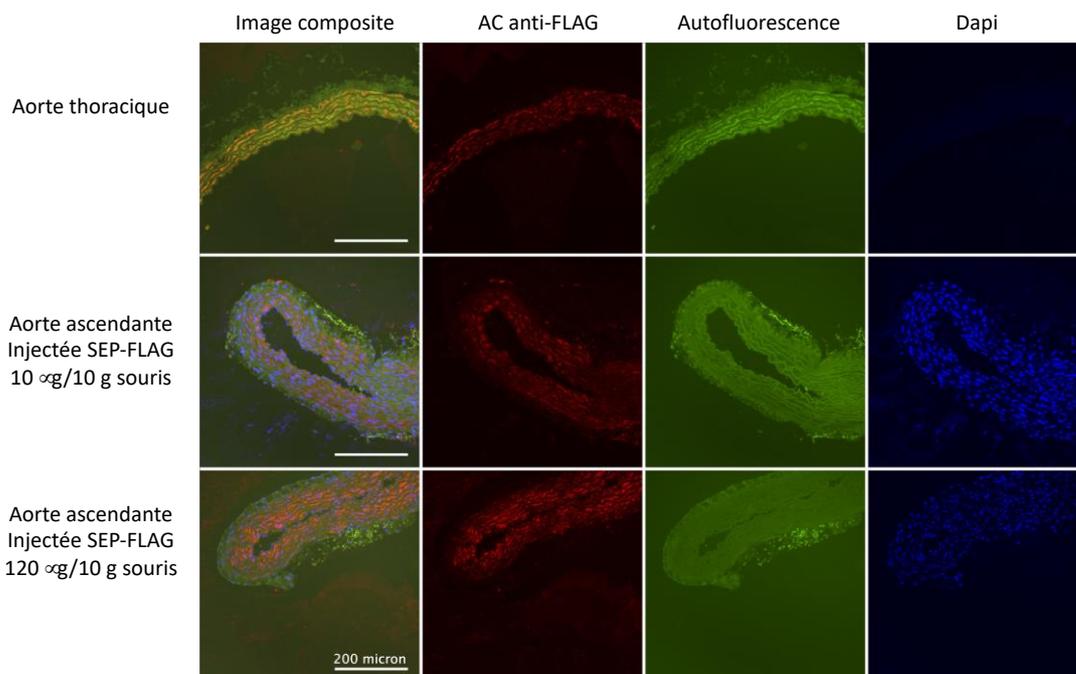
La première expérimentation de cette thèse a consisté à déterminer la dose de SEP à injecter aux différents animaux pour la suite des expérimentations. Ainsi, une cohorte d'animaux a été injectée à des doses croissantes de SEP (de 1 à 20 µg/g souris) afin d'obtenir une estimation de l'intégration de la SEP dans la paroi vasculaire de manière quantitative par fluorescence en histologie, et ainsi déterminer de manière factuelle la dose la plus adaptée à la suite de l'expérimentation.

Les premières données obtenues (Figure 74) semblaient intéressantes. Elles ont montré que les échantillons injectés présentaient bien un marquage de la SEP par

l'anticorps anti-FLAG indiquant la présence de SEP (rouge), entre les lames élastiques, au niveau des CMLVs. Le marquage semblait aussi plus intense concernant l'échantillon injecté à une concentration de 12  $\mu\text{g}$  de SEP/g de souris, que pour l'échantillon injecté à une concentration de 1  $\mu\text{g}$  de SEP/1g de souris. Il semblait également y avoir un gradient de marquage plus fort au niveau des lames internes diminuant vers l'extérieur.

Ces données confirmaient les expérimentations préliminaires (voir chapitre 5.2 et la Figure 57) et le fait que la SEP traverse la barrière endothéliale pour s'intégrer à la paroi, l'augmentation de la concentration de SEP injectée semblant avoir un impact sur la quantité de SEP présente dans la paroi.

Cependant, cette première série d'études des effets d'une injection de la SEP a fait face à un problème majeur : un signal du FLAG de la SEP révélé par l'anticorps anti-FLAG, théoriquement très spécifique, a été détecté dans la paroi aortique des animaux traités avec la SEP mais, de manière très surprenante, ce signal a été également détecté dans la paroi aortique des souris témoins (non traitées). Cela remet fortement en cause la validité des observations (Figure 74).

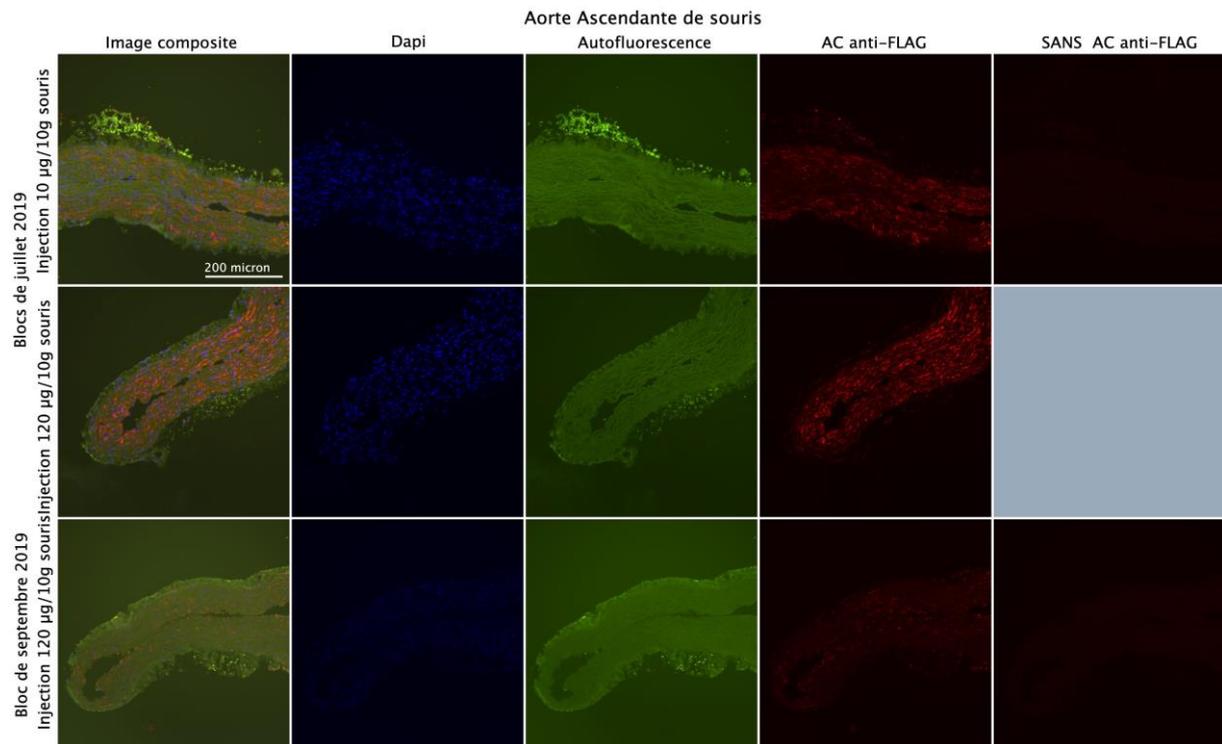


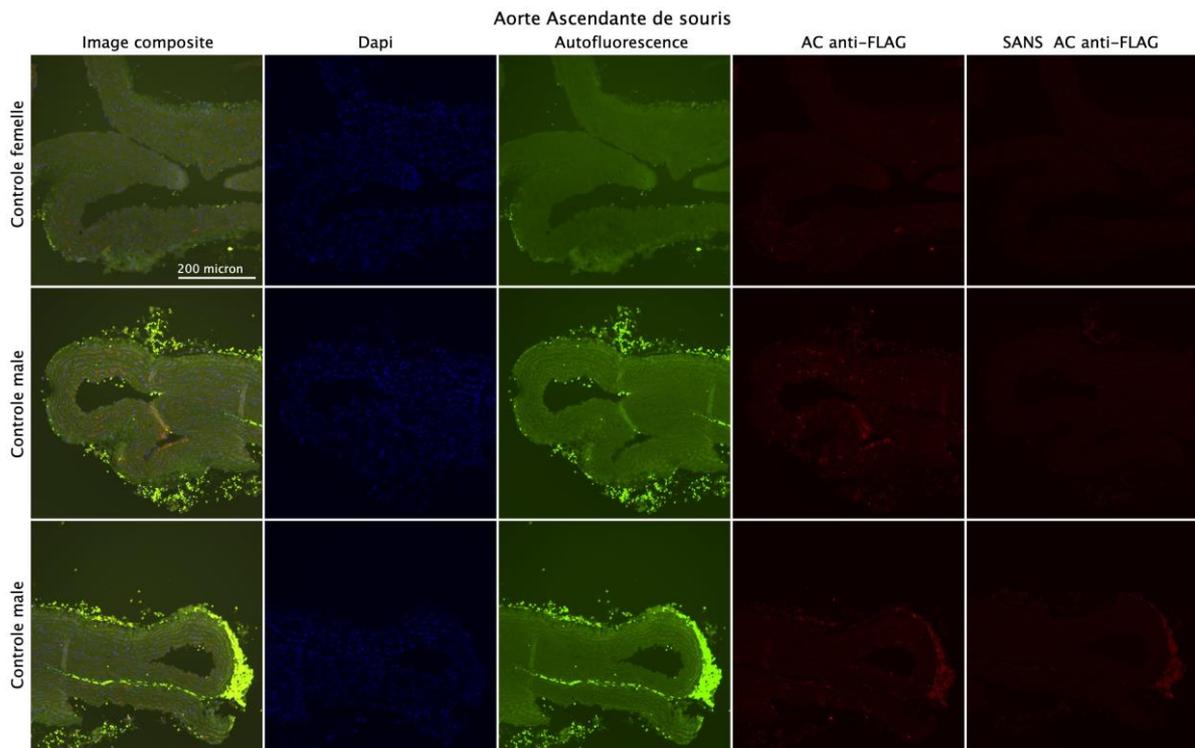
**Figure 74 - Histologie en immunofluorescence de coupes d'aortes ascendantes injectées à des doses croissantes de SEP (1 et 12  $\mu\text{g}$  de SEP/10g de souris) comparées à une coupe d'aorte thoracique témoin non injectée.**

Il a donc été décidé de réaliser une nouvelle série d'injections pour obtenir au finale une cohorte de 12 animaux (6 mâles et 6 femelles) injectés à des doses de 1 ; 4,4 ; 8 ; 12 ; 16  $\mu\text{g}$  de SEP/g de souris ainsi que 2 animaux témoins (1 mâle et 1 femelle) injectés avec une solution de NaCl et préparés dans les mêmes conditions que les injections de concentrations croissantes de SEP (Figure 75).

Les résultats de cette seconde série d'injections sont assez déconcertants : sur tous les échantillons de souris collectés, les lames élastiques apparaissent en négatif, le marquage DAPI est très faible. De plus, le marquage avec l'Anticorps anti-FLAG indiquant la présence de SEP (Rouge) est relativement faible (Figure 75, « blocs de septembre 2019 »), alors que ce dernier était intense pour les échantillons de souris injectées avec 1 et 12  $\mu\text{g/g}$  de souris dans les premiers échantillons analysés (Figure 75, « Blocs de juillet 2019 »).

Différentes actions ont été entreprises afin d'identifier d'éventuels biais d'expérimentation lors de la coloration des échantillons (en modifiant les paramètres pour le démasquage, la perméabilisation, la saturation et/ou en réalisant des lavages plus stringents). Afin d'éliminer tout biais éventuel dans le processus d'inclusion et de fixation des échantillons, nous avons également réalisé de nouvelles inclusions à la fois en paraffine, mais également en OCT (optimal cutting temperature compound) afin de s'affranchir de l'inclusion et la déshydrations et faciliter la coloration de l'échantillon. Mais aucune de ces expérimentations ne s'est montrée efficace, particulièrement sur la spécificité des différents anticorps anti-FLAG utilisés qui ont systématiquement montré un signal aussi dans les échantillons témoins.





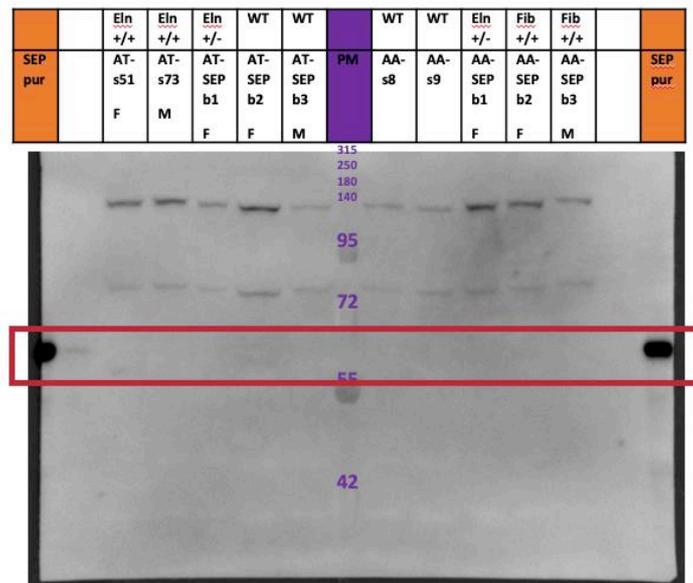
**Figure 75 – Histologie en immunofluorescence de coupes d’aortes ascendantes injectées avec une solution de NaCl (témoins) ou injectées par une solution de SEP.**

Nous avons donc décidé de changer de techniques d’identification de la SEP dans la paroi artérielle en utilisant différents protocoles de Western Blots sur des lysats d’aortes d’animaux injectés préalablement avec de la SEP ou son témoin (injectés avec une solution de NaCl). Malheureusement, nous avons également été confrontés au problème de spécificité de l’anticorps anti-flag avec cette technique, avec un signal « anti-Flag » apparaissant aussi bien dans les tissus d’animaux traités avec la SEP que dans les tissus d’animaux témoins (Figure 76).



**Figure 76 - Image d'un western blot réalisé avec un anticorps anti-FLAG montrant l'absence de spécificité de l'anticorps anti-FLAG**

Il n'a donc pas été possible de comprendre comment un anticorps commercial dirigé contre une séquence artificielle Flag pouvait générer un signal fort dans des animaux non traités et donc ne contenant à priori pas de séquences Flag. Peut-être cet anticorps n'est-il pas aussi spécifique que ce que le fabricant indique. Pour tenter de lever cet obstacle technique, nous avons ensuite modifié l'élément permettant l'identification de la SEP au sein de l'organisme étudié en remplaçant le FLAG par de la biotine sur la SEP, et en réalisant ensuite des westerns blots selon un protocole de détection de la biotine par de la streptavidine. Dans ces nouvelles expériences préliminaires, nous n'avons pas été en mesure de détecter la SEP dans les extraits protéiques tissulaires, à un poids moléculaire correspondant (Figure 77, cadre rouge).



**Figure 77 - Image d'un western blot réalisé à partir d'un protocole de détection streptavidine/biotine, montrant l'absence de détection de protéines au poids moléculaire de référence (cadre rouge). F : Femelle ; M : Mâle ; PM : poids moléculaire ; AT : Aorte thoracique ; AA : Aorte Abdominales ; WT : Wild type (animaux C57Bl/6j); Eln<sup>+/-</sup> : animaux haploinsuffisants pour l'élastine ; Eln<sup>+/+</sup> : animaux témoins ayant le même fond génétique que les animaux Eln<sup>+/-</sup>.**

De plus, des images d'immunofluorescence ont été réalisées par nos partenaires du LBTI (Lyon) après injection de SEP biotinylée dans des souris, aboutissant au même résultat qu'avec la SEP-FLAG, c'est-à-dire une absence de spécificité de détection de la SEP et l'obtention d'un signal y compris pour les animaux non traités (données non présentées). Il n'est à ce stade pas à exclure la possibilité que la SEP-biotine soit processée par l'organisme receveur et que la SEP ne soit ainsi plus détectable ou encore que la quantité de protéine présente dans le lysat ne soit pas suffisante pour être détectable pour cette technique. Cependant, à ce jour, il nous est donc impossible d'affirmer la présence de SEP dans la paroi artérielle, et donc dans les lames élastiques. Ainsi, la conception d'une nouvelle stratégie d'identification de la SEP dans la paroi aortique sera nécessaire, potentiellement par la génération de SEP couplée à de l'or afin de réaliser une détection en microscopie électronique. Cette technique aurait l'avantage de nous donner plus de précisions quant au devenir de la SEP dans la paroi, et de savoir si la SEP intègre les lames élastiques ou colocalise simplement

avec elles, ce qui permettrait de formuler ouvertement l'hypothèse que la SEP pourrait directement, par insertion, réparer les fibres élastiques dégradées en remplaçant les portions manquantes/lysées.

# Conclusions et perspectives

Cette thèse, et plus généralement le projet Arterylastic, validés par l'article princeps sur les effets de la SEP dans le cadre d'une déficience génétique en élastine que nous avons pu publier, est la première pierre posant les fondations de l'étude d'une molécule à fort potentiel dans le traitement des altérations des fibres élastiques. Les premières données recueillies sont très prometteuses pour la SEP avec un impact positif sur la structure et la fonction mécanique cardiovasculaire, avec également des effets bénéfiques sur la réactivité vasculaire, en rétablissement la dysfonction endothéliale observée chez les souris femelles *Eln*<sup>+/-</sup>.

Plusieurs autres publications pourraient compléter ce travail de thèse dans les semaines/mois à venir puisque les expérimentations d'artériographie de pression analysant les effets de la SEP des différents axes présentent des effets prometteurs sur la mécanique artérielle. Ces résultats devront être complétés par des études de la réactivité vasculaire, des études biochimiques et d'histologie similaires à celles présentées dans l'article concernant l'axe de déficience génétique en élastine (Boëté et al. 2022). De plus, nos expérimentations nous ont également permis d'étudier deux autres artères d'intérêt (artère fémorale et artère pulmonaire). Lorsqu'elles seront finalisées, ces études complémentaires nous permettront d'obtenir un regard plus global sur les effets de la SEP sur l'ensemble du système cardiovasculaire qui devraient également faire l'objet d'articles étayant les propriétés de la SEP.

Pour autant, ce travail de thèse et plus largement la première partie du projet Arterylastic qui se terminera dans les mois à venir, ne seront que les prémices de l'étude de cette molécule prometteuse qu'est la SEP. L'un des éléments prioritaires à investiguer sera les mécanismes d'actions de la SEP et particulièrement sa capacité à intégrer la paroi des vaisseaux artériels. Notre incapacité à objectiver la présence de SEP dans la paroi des vaisseaux restreint notre compréhension de l'action de la SEP. De plus, cela nous limite dans l'une des deux hypothèses de ce projet qui était que la SEP, notamment du fait de ses capacités de coacervation puisse s'insérer dans les fibres élastiques pour agir comme une « prothèse moléculaire » afin de compenser la perte d'élasticité des fibres élastiques existantes altérées. Pour le moment, sans exclure la possibilité qu'une intégration directe de la SEP dans la paroi aortique et les fibres élastiques puisse se produire et participer aux effets observés, nous privilégions donc la seconde hypothèse d'une signalisation cellulaire de la SEP pour expliquer les changements observés dans les aortes des animaux étudiés. La conception d'une nouvelle stratégie d'identification de la SEP dans la paroi aortique sera donc toutefois nécessaire, potentiellement en réalisant des études par microscopie électronique en couplant la SEP à de l'or. Une alternative pourrait être un suivi radio-isotopique de SEP marquée. Cela permettrait en premier lieu de vérifier si la SEP, qui reste présente dans l'organisme plusieurs jours après l'injection, peut sortir de la circulation sanguine ou si elle est rapidement éliminée ou encore stockée. Cette stratégie de radio-marquage aurait également l'intérêt de permettre d'étudier le devenir de la SEP dans l'organisme et d'identifier de potentiels lieux de stockage préférentiels de la molécule dans l'organisme plusieurs jours après l'injection. Une expérimentation intéressante qui a été évoquée, mais n'a pas pu être mise en œuvre du fait des difficultés de détection de la SEP *in vivo* est l'étude des effets cardiovasculaires d'une injection de

SEP à des animaux *Eln<sup>-/-</sup>* (qui meurent dans les 72h suivant la naissance), soit par une injection directe immédiatement après la naissance, soit en injectant la mère au cours de la gestation, cela aurait impliqué de vérifier le passage transplacentaire de la SEP. L'étude de la présence et du comportement de la SEP *in vivo* dans un organisme dépourvu d'élastine serait particulièrement pertinente, car il permettrait de vérifier si la SEP constitue un apport de protéine élastique suffisant pour compenser, au moins en partie, les effets physiopathologiques de l'absence d'élastine chez ces animaux.

Enfin, au vu des effets physiopathologiques des EDPs auxquels la SEP peut être assimilée, il sera indispensable de réaliser des études pharmacocinétiques d'administration de la SEP de façon chronique. Cela permettra potentiellement d'observer les effets prometteurs de la SEP sur l'ensemble des axes étudiés et de pouvoir limiter les éventuels effets indésirables comme l'hypertrophie cardiaque qui est un frein à l'utilisation d'autres molécules prometteuses comme le minoxidil (Oye, Oye, et Ali 2021). De plus, de telles études permettront d'affiner le protocole d'administration de la SEP : il est probable qu'une injection chronique de SEP puisse favoriser les effets sur les différents groupes pour lesquels le protocole actuel a présenté des limites. Il est également très probable qu'un protocole unique d'injection de la SEP ne pourra pas être appliqué pour les différents axes au vu des différentes pathologies provoquant une altération des fibres élastiques et de leurs caractéristiques respectives (Fhayli, Boëté et al. 2019).

# Références

- Aaron, B. B., et J. M. Gosline. 1981. « Elastin as a Random-Network Elastomer: A Mechanical and Optical Analysis of Single Elastin Fibers ». *Biopolymers* 20 (6): 1247-60. <https://doi.org/10.1002/bip.1981.360200611>.
- Afratis, Nikos, Chrisostomi Gialeli, Dragana Nikitovic, Theodore Tsegenidis, Evgenia Karousou, Achilleas D. Theocharis, Mauro S. Pavão, George N. Tzanakakis, et Nikos K. Karamanos. 2012. « Glycosaminoglycans: Key Players in Cancer Cell Biology and Treatment ». *The FEBS Journal* 279 (7): 1177-97. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08529.x>.
- Ahimastos, Anna A., Melissa Formosa, Anthony M. Dart, et Bronwyn A. Kingwell. 2003. « Gender Differences in Large Artery Stiffness Pre- and Post Puberty ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88 (11): 5375-80. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-030722>.
- Aitoufella, H, E Maury, B Guidet, et G Offenstadt. 2008. « L'endothélium : un nouvel organe ». *Réanimation* 17 (2): 126-36. <https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2007.12.005>.
- Alapa, Maryam, Chuanlong Cui, Ping Shu, Hong Li, Vlad Kholodovych, et Annie Beuve. 2021. « Selective Cysteines Oxidation in Soluble Guanylyl Cyclase Catalytic Domain Is Involved in NO Activation ». *Free Radical Biology & Medicine* 162 (janvier): 450-60. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.11.001>.
- Albrecht, Camille, Andrey S. Kuznetsov, Aline Appert-Collin, Zineb Dhaideh, Maïté Callewaert, Yaroslav V. Bershatsky, Anatoly S. Urban, et al. 2020. « Transmembrane Peptides as a New Strategy to Inhibit Neuraminidase-1 Activation ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8: 611121. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.611121>.
- Allahdadi, Kyan J., Benjimen R. Walker, et Nancy L. Kanagy. 2007. « ROK Contribution to Endothelin-Mediated Contraction in Aorta and Mesenteric Arteries Following Intermittent Hypoxia/Hypercapnia in Rats ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 293 (5): H2911-2918. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00217.2007>.
- Altobelli, Emma, Leonardo Rapacchietta, Valerio F. Profeta, et Roberto Fagnano. 2018. « Risk Factors for Abdominal Aortic Aneurysm in Population-Based Studies: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15 (12): E2805. <https://doi.org/10.3390/ijerph15122805>.
- Alvira, Cristina M., Christophe Guignabert, Yu-Mee Kim, Chihhsin Chen, Lingli Wang, Trang T. Duong, Rae S. M. Yeung, Dean Y. Li, et Marlene Rabinovitch. 2011. « Inhibition of Transforming Growth Factor  $\beta$  Worsens Elastin Degradation in a Murine Model of Kawasaki Disease ». *The American Journal of Pathology* 178 (3): 1210-20. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.11.054>.
- Amith, Schammim Ray, Preethi Jayanth, Susan Franchuk, Trisha Finlay, Volkan Seyrantepe, Rudi Beyaert, Alexey V. Pshezhetsky, et Myron R. Szewczuk. 2010. « Neu1 Desialylation of Sialyl Alpha-2,3-Linked Beta-Galactosyl Residues of TOLL-like Receptor 4 Is Essential for Receptor Activation and Cellular Signaling ». *Cellular Signalling* 22 (2): 314-24. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.09.038>.

- Amith, Schammim Ray, Preethi Jayanth, Susan Franchuk, Sarah Siddiqui, Volkan Seyrantepe, Katrina Gee, Sameh Basta, Rudi Beyaert, Alexey V. Pshezhetsky, et Myron R. Szewczuk. 2009. « Dependence of Pathogen Molecule-Induced Toll-like Receptor Activation and Cell Function on Neu1 Sialidase ». *Glycoconjugate Journal* 26 (9): 1197-1212. <https://doi.org/10.1007/s10719-009-9239-8>.
- Ancoli-Israel, S., D. F. Kripke, M. R. Klauber, R. Fell, C. Stepnowsky, E. Estline, N. Khazeni, et A. Chinn. 1996. « Morbidity, Mortality and Sleep-Disordered Breathing in Community Dwelling Elderly ». *Sleep* 19 (4): 277-82. <https://doi.org/10.1093/sleep/19.4.277>.
- Angeloni, C., E. Leoncini, M. Malaguti, S. Angelini, P. Hrelia, et S. Hrelia. 2008. « Role of Quercetin in Modulating Rat Cardiomyocyte Gene Expression Profile ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 294 (3): H1233-1243. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01091.2007>.
- Antonicelli, Frank, Georges Bellon, Sandrine Lorimier, et William Hornebeck. 2009. « Role of the Elastin Receptor Complex (S-Gal/Cath-A/Neu-1) in Skin Repair and Regeneration ». *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 17 (5): 631-38. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00525.x>.
- Apostolov, Eugene O., Debarati Ray, Alena V. Savenka, Sudhir V. Shah, et Alexei G. Basnakian. 2010. « Chronic Uremia Stimulates LDL Carbamylation and Atherosclerosis ». *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 21 (11): 1852-57. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010040365>.
- Arnaud, Claire, Pauline C. Beguin, Sylvie Lantuejoul, Jean-Louis Pepin, Christiane Guillermet, Graziano Pelli, Fabienne Burger, et al. 2011a. « The Inflammatory Preatherosclerotic Remodeling Induced by Intermittent Hypoxia Is Attenuated by RANTES/CCL5 Inhibition ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 184 (6): 724-31. <https://doi.org/10.1164/rccm.201012-2033OC>.
- Arnaud, Claire, Laureline Poulain, Patrick Lévy, et Maurice Dematteis. 2011. « Inflammation Contributes to the Atherogenic Role of Intermittent Hypoxia in Apolipoprotein-E Knock out Mice ». *Atherosclerosis* 219 (2): 425-31. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.07.122>.
- Arnett, Donna K., Roger S. Blumenthal, Michelle A. Albert, Andrew B. Buroker, Zachary D. Goldberger, Ellen J. Hahn, Cheryl Dennison Himmelfarb, et al. 2019. « 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease ». *Circulation* 140 (11): e596-646. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000678>.
- Aronson, Doron. 2003. « Cross-Linking of Glycated Collagen in the Pathogenesis of Arterial and Myocardial Stiffening of Aging and Diabetes ». *Journal of Hypertension* 21 (1): 3-12. <https://doi.org/10.1097/00004872-200301000-00002>.
- Arsenis, Nicole C., Tongjian You, Elisa F. Ogawa, Grant M. Tinsley, et Li Zuo. 2017.

« Physical Activity and Telomere Length: Impact of Aging and Potential Mechanisms of Action ». *Oncotarget* 8 (27): 45008-19. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16726>.

Astrand, H., J. Stalhand, J. Karlsson, M. Karlsson, B. Sonesson, et T. Länne. 2011. « In Vivo Estimation of the Contribution of Elastin and Collagen to the Mechanical Properties in the Human Abdominal Aorta: Effect of Age and Sex ». *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 110 (1): 176-87. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00579.2010>.

Attia-Vigneau, Joan, Christine Terryn, Sandrine Lorimier, Jerome Sandre, Frank Antonicelli, et William Hornebeck. 2014. « Regeneration of Human Dermis by a Multi-Headed Peptide ». *The Journal of Investigative Dermatology* 134 (1): 58-67. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.290>.

Aumailley, Monique. 2013. « The Laminin Family ». *Cell Adhesion & Migration* 7 (1): 48-55. <https://doi.org/10.4161/cam.22826>.

Avolio, Alberto. 2013. « Arterial Stiffness ». *Pulse* 1 (1): 14-28. <https://doi.org/10.1159/000348620>.

Azevedo, J., I. Arroja, A. Jacques, I. Santos, P. Amado, J. C. Marques, et V. Araújo. 1993. « [A double ambulatory product (blood pressure and heart rate), mild arterial hypertension and left ventricular hypertrophy] ». *Revista Portuguesa De Cardiologia: Orgao Oficial Da Sociedade Portuguesa De Cardiologia = Portuguese Journal of Cardiology: An Official Journal of the Portuguese Society of Cardiology* 12 (7-8): 663-73, 602.

Bakris, George L., Alan J. Bank, David A. Kass, Joel M. Neutel, Richard A. Preston, et Suzanne Oparil. 2004. « Advanced Glycation End-Product Cross-Link Breakers. A Novel Approach to Cardiovascular Pathologies Related to the Aging Process ». *American Journal of Hypertension* 17 (12 Pt 2): 23S-30S. <https://doi.org/10.1016/j.amjhyper.2004.08.022>.

Balan, Estelle, Anabelle Decottignies, et Louise Deldicque. 2018. « Physical Activity and Nutrition: Two Promising Strategies for Telomere Maintenance? ». *Nutrients* 10 (12): E1942. <https://doi.org/10.3390/nu10121942>.

Baldwin, Andrew K., Andreja Simpson, Ruth Steer, Stuart A. Cain, et Cay M. Kielty. 2013. « Elastic Fibres in Health and Disease ». *Expert Reviews in Molecular Medicine* 15 (août): e8. <https://doi.org/10.1017/erm.2013.9>.

Baranek, Thomas, Romain Debret, Frank Antonicelli, Bouchaib Lamkhioued, Azzaq Belaaouaj, William Hornebeck, Philippe Bernard, Moncef Guenounou, et Richard Le Naour. 2007. « Elastin Receptor (Spliced Galactosidase) Occupancy by Elastin Peptides Counteracts Proinflammatory Cytokine Expression in Lipopolysaccharide-Stimulated Human Monocytes through NF-KappaB down-Regulation ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179 (9): 6184-92. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.9.6184>.

Basnakian, Alexei G., Sudhir V. Shah, Ercan Ok, Ekrem Altunel, et Eugene O. Apostolov. 2010. « Carbamylated LDL ». *Advances in Clinical Chemistry* 51: 25-52. [https://doi.org/10.1016/s0065-2423\(10\)51002-3](https://doi.org/10.1016/s0065-2423(10)51002-3).

Bauman, Tyler M., Tristan M. Nicholson, Lisa L. Abler, Kevin W. Eliceiri, Wei Huang, Chad M. Vezina, et William A. Ricke. 2014. « Characterization of Fibrillar Collagens

and Extracellular Matrix of Glandular Benign Prostatic Hyperplasia Nodules ». *PLoS ONE* 9 (10): e109102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109102>.

Bax, Daniel V., Sarah E. Bernard, Amanda Lomas, Amanda Morgan, Jon Humphries, C. Adrian Shuttleworth, Martin J. Humphries, et Cay M. Kielty. 2003. « Cell Adhesion to Fibrillin-1 Molecules and Microfibrils Is Mediated by Alpha 5 Beta 1 and Alpha v Beta 3 Integrins ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (36): 34605-16. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303159200>.

Bax, Daniel V., Ursula R. Rodgers, Marcela M. M. Bilek, et Anthony S. Weiss. 2009. « Cell Adhesion to Tropoelastin Is Mediated via the C-Terminal GRKRK Motif and Integrin AlphaVbeta3 ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (42): 28616-23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.017525>.

Belaidi, Elise, Charles Khouri, Olfa Harki, Sébastien Baillieux, Gilles Faury, Anne Briançon-Marjollet, Jean-Louis Pépin, et Claire Arnaud. 2022. « Cardiac Consequences of Intermittent Hypoxia: A Matter of Dose? A Systematic Review and Meta-Analysis in Rodents ». *European Respiratory Review: An Official Journal of the European Respiratory Society* 31 (164): 210269. <https://doi.org/10.1183/16000617.0269-2021>.

Belkin, A. M., et M. A. Stepp. 2000. « Integrins as Receptors for Laminins ». *Microscopy Research and Technique* 51 (3): 280-301. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20001101\)51:3<280::AID-JEMT7>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20001101)51:3<280::AID-JEMT7>3.0.CO;2-O).

Bella, Jordi, et David J. S. Hulmes. 2017. « Fibrillar Collagens ». *Sub-Cellular Biochemistry* 82: 457-90. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-49674-0\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-319-49674-0_14).

Benjafield, Adam V., Najib T. Ayas, Peter R. Eastwood, Raphael Heinzer, Mary S. M. Ip, Mary J. Morrell, Carlos M. Nunez, et al. 2019. « Estimation of the Global Prevalence and Burden of Obstructive Sleep Apnoea: A Literature-Based Analysis ». *The Lancet Respiratory Medicine* 7 (8): 687-98. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(19\)30198-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(19)30198-5).

Benke, Kálmán, Bence Ágg, Bálint Szilveszter, Ferenc Tarr, Zsolt B. Nagy, Miklós Pólos, László Daróczi, Béla Merkely, et Zoltán Szabolcs. 2013. « The Role of Transforming Growth Factor-Beta in Marfan Syndrome ». *Cardiology Journal* 20 (3): 227-34. <https://doi.org/10.5603/CJ.2013.0066>.

Bird, L. M., G. F. Billman, R. V. Lacro, R. L. Spicer, L. K. Jariwala, H. E. Hoyme, R. Zamora-Salinas, et al. 1996. « Sudden Death in Williams Syndrome: Report of Ten Cases ». *The Journal of Pediatrics* 129 (6): 926-31. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(96\)70042-2](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(96)70042-2).

Bironneau, Vanessa, Renaud Tamisier, Wojciech Trzepizur, Ramaroson Andriantsitohaina, Mathieu Berger, François Goupil, Marie Joyeux-Faure, et al. 2020. « Sleep Apnoea and Endothelial Dysfunction: An Individual Patient Data Meta-Analysis ». *Sleep Medicine Reviews* 52 (août): 101309. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2020.101309>.

Bkaily, Ghassan, Nadia Abou Abdallah, Yanick Simon, Ashley Jazzar, et Danielle Jacques. 2021. « Vascular smooth muscle remodeling in health and disease ». *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 99 (2): 171-78. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2020-0399>.

Blaise, Sébastien, Béatrice Romier, Charlotte Kawecky, Maxime Ghirardi, Fanja

Rabenoelina, Stéphanie Baud, Laurent Duca, et al. 2013. « Elastin-Derived Peptides Are New Regulators of Insulin Resistance Development in Mice ». *Diabetes* 62 (11): 3807-16. <https://doi.org/10.2337/db13-0508>.

Bliwise, D. L., N. G. Bliwise, M. Partinen, A. M. Pursley, et W. C. Dement. 1988. « Sleep Apnea and Mortality in an Aged Cohort ». *American Journal of Public Health* 78 (5): 544-47. <https://doi.org/10.2105/ajph.78.5.544>.

Blood, C. H., J. Sasse, P. Brodt, et B. R. Zetter. 1988. « Identification of a Tumor Cell Receptor for VGVAPG, an Elastin-Derived Chemotactic Peptide ». *The Journal of Cell Biology* 107 (5): 1987-93. <https://doi.org/10.1083/jcb.107.5.1987>.

Blumenthal, James A., Michael A. Babyak, Alan Hinderliter, Lana L. Watkins, Linda Craighead, Pao-Hwa Lin, Carla Caccia, Julie Johnson, Robert Waugh, et Andrew Sherwood. 2010. « Effects of the DASH Diet Alone and in Combination with Exercise and Weight Loss on Blood Pressure and Cardiovascular Biomarkers in Men and Women with High Blood Pressure: The ENCORE Study ». *Archives of Internal Medicine* 170 (2): 126-35. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2009.470>.

Bochicchio, Brigida, Giselle C. Yeo, Pearl Lee, Deniz Emul, Antonietta Pepe, Antonio Laezza, Nicola Ciarfaglia, Daniela Quaglino, et Anthony S. Weiss. 2021. « Domains 12 to 16 of Tropoelastin Promote Cell Attachment and Spreading through Interactions with Glycosaminoglycan and Integrins AlphaV and Alpha5beta1 ». *The FEBS Journal* 288 (13): 4024-38. <https://doi.org/10.1111/febs.15702>.

Boëté, Quentin, Ming Lo, Kiao-Ling Liu, Guillaume Vial, Emeline Lemarié, Maxime Rougelot, Iris Steuckardt, et al. 2022. « Physiological Impact of a Synthetic Elastic Protein in Arterial Diseases Related to Alterations of Elastic Fibers: Effect on the Aorta of Elastin-Haploinsufficient Male and Female Mice ». *International Journal of Molecular Sciences* 23 (21): 13464. <https://doi.org/10.3390/ijms232113464>.

Bonten, E., A. van der Spoel, M. Fornerod, G. Grosveld, et A. d'Azzo. 1996. « Characterization of Human Lysosomal Neuraminidase Defines the Molecular Basis of the Metabolic Storage Disorder Sialidosis ». *Genes & Development* 10 (24): 3156-69. <https://doi.org/10.1101/gad.10.24.3156>.

Boraldi, Federica, Pasquale Moscarelli, Brigida Bochicchio, Antonietta Pepe, Anna M. Salvi, et Daniela Quaglino. 2018. « Heparan Sulfates Facilitate Harmless Amyloidogenic Fibril Formation Interacting with Elastin-like Peptides ». *Scientific Reports* 8 (1): 3115. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21472-0>.

Bouhedja, Mourad, Basile Peres, Wassim Fhayli, Zeinab Ghandour, Ahcène Boumendjel, Gilles Faury, et Smail Khelili. 2018. « Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Ring-Opened Cromakalim Analogues with Relaxant Effects on Vascular and Respiratory Smooth Muscles and as Stimulators of Elastin Synthesis ». *European Journal of Medicinal Chemistry* 144 (janvier): 774-96. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.071>.

Bouider, Nafila, Wassim Fhayli, Zeinab Ghandour, Marjorie Boyer, Kamel Harrouche, Xavier Florence, Bernard Pirotte, Philippe Lebrun, Gilles Faury, et Smail Khelili. 2015. « Design and Synthesis of New Potassium Channel Activators Derived from the Ring Opening of Diazoxide: Study of Their Vasodilatory Effect, Stimulation of Elastin Synthesis and Inhibitory Effect on Insulin Release ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 23 (8): 1735-46. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.02.043>.

Bourdier, Guillaume, Maximin Détrait, Sophie Bouyon, Emeline Lemarié, Sandrine Brasseur, Stéphane Doutreleau, Jean-Louis Pépin, Diane Godin-Ribuot, Elise Belaidi, et Claire Arnaud. 2020. « Intermittent Hypoxia Triggers Early Cardiac Remodeling and Contractile Dysfunction in the Time-Course of Ischemic Cardiomyopathy in Rats ». *Journal of the American Heart Association* 9 (16): e016369. <https://doi.org/10.1161/JAHA.120.016369>.

Bourgot, Isabelle, Irina Primac, Thomas Louis, Agnès Noël, et Erik Maquoi. 2020. « Reciprocal Interplay Between Fibrillar Collagens and Collagen-Binding Integrins: Implications in Cancer Progression and Metastasis ». *Frontiers in Oncology* 10: 1488. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01488>.

Boyd, C. D., A. M. Christiano, R. A. Pierce, C. A. Stolle, et S. B. Deak. 1991. « Mammalian Tropoelastin: Multiple Domains of the Protein Define an Evolutionarily Divergent Amino Acid Sequence ». *Matrix (Stuttgart, Germany)* 11 (4): 235-41. [https://doi.org/10.1016/s0934-8832\(11\)80230-1](https://doi.org/10.1016/s0934-8832(11)80230-1).

Brassart, B., A. Randoux, W. Hornebeck, et H. Emonard. 1998. « Regulation of Matrix Metalloproteinase-2 (Gelatinase A, MMP-2), Membrane-Type Matrix Metalloproteinase-1 (MT1-MMP) and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2 (TIMP-2) Expression by Elastin-Derived Peptides in Human HT-1080 Fibrosarcoma Cell Line ». *Clinical & Experimental Metastasis* 16 (6): 489-500. <https://doi.org/10.1023/a:1006550503612>.

Bredfeldt, Jeremy S., Yuming Liu, Carolyn A. Pehlke, Matthew W. Conklin, Joseph M. Szulczewski, David R. Inman, Patricia J. Keely, Robert D. Nowak, Thomas R. Mackie, et Kevin W. Eliceiri. 2014. « Computational segmentation of collagen fibers from second-harmonic generation images of breast cancer ». *Journal of Biomedical Optics* 19 (1): 016007. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.19.1.016007>.

Breier, G., F. Breviario, L. Caveda, R. Berthier, H. Schnürch, U. Gotsch, D. Vestweber, W. Risau, et E. Dejana. 1996. « Molecular Cloning and Expression of Murine Vascular Endothelial-Cadherin in Early Stage Development of Cardiovascular System ». *Blood* 87 (2): 630-41.

Bretaudeau, Clara, Stéphanie Baud, Aurélie Dupont-Deshorgue, Rémi Cousin, Bertrand Brassart, et Sylvie Brassart-Pasco. 2020. « AG-9, an Elastin-Derived Peptide, Increases In Vitro Oral Tongue Carcinoma Cell Invasion, through an Increase in MMP-2 Secretion and MT1-MMP Expression, in a RPSA-Dependent Manner ». *Biomolecules* 11 (1): 39. <https://doi.org/10.3390/biom11010039>.

Brieler, Jay, Matthew A. Breeden, et Jane Tucker. 2017. « Cardiomyopathy: An Overview ». *American Family Physician* 96 (10): 640-46.

Brouillette, Scott, Ravi K. Singh, John R. Thompson, Alison H. Goodall, et Nilesh J. Samani. 2003. « White Cell Telomere Length and Risk of Premature Myocardial Infarction ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23 (5): 842-46. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000067426.96344.32>.

Brown-Augsburger, P., T. Broekelmann, L. Mecham, R. Mercer, M. A. Gibson, E. G. Cleary, W. R. Abrams, J. Rosenbloom, et R. P. Mecham. 1994. « Microfibril-Associated Glycoprotein Binds to the Carboxyl-Terminal Domain of Tropoelastin and Is a Substrate for Transglutaminase ». *The Journal of Biological Chemistry* 269 (45): 28443-49.

- Brown-Augsburger, P., T. Broekelmann, J. Rosenbloom, et R. P. Mecham. 1996. « Functional Domains on Elastin and Microfibril-Associated Glycoprotein Involved in Elastic Fibre Assembly ». *The Biochemical Journal* 318 ( Pt 1): 149-55. <https://doi.org/10.1042/bj3180149>.
- Bruning, Ansgar. 2013. « Inhibition of MTOR Signaling by Quercetin in Cancer Treatment and Prevention ». *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 13 (7): 1025-31. <https://doi.org/10.2174/18715206113139990114>.
- Bultema, Jarred J., et Santiago M. Di Pietro. 2013. « Cell Type-Specific Rab32 and Rab38 Cooperate with the Ubiquitous Lysosome Biogenesis Machinery to Synthesize Specialized Lysosome-Related Organelles ». *Small GTPases* 4 (1): 16-21. <https://doi.org/10.4161/sgtp.22349>.
- Bultmann-Mellin, Insa, Anne Conradi, Alexandra C. Maul, Katharina Dinger, Frank Wempe, Alexander P. Wohl, Thomas Imhof, et al. 2015. « Modeling Autosomal Recessive Cutis Laxa Type 1C in Mice Reveals Distinct Functions for Ltbp-4 Isoforms ». *Disease Models & Mechanisms* 8 (4): 403-15. <https://doi.org/10.1242/dmm.018960>.
- Burch, Thomas M., Francis X. McGowan, Barry D. Kussman, Andrew J. Powell, et James A. DiNardo. 2008. « Congenital Supravalvular Aortic Stenosis and Sudden Death Associated with Anesthesia: What's the Mystery? ». *Anesthesia and Analgesia* 107 (6): 1848-54. <https://doi.org/10.1213/ane.0b013e3181875a4d>.
- Burton, A. C. 1954. « Relation of Structure to Function of the Tissues of the Wall of Blood Vessels ». *Physiological Reviews* 34 (4): 619-42. <https://doi.org/10.1152/physrev.1954.34.4.619>.
- Cai, Zeyu, Ze Gong, Zhiqing Li, Li Li, et Wei Kong. 2021. « Vascular Extracellular Matrix Remodeling and Hypertension ». *Antioxidants & Redox Signaling* 34 (10): 765-83. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8110>.
- Cain, Stuart A., Ewa J. Mularczyk, Mukti Singh, Teresa Massam-Wu, et Cay M. Kielty. 2016. « ADAMTS-10 and -6 Differentially Regulate Cell-Cell Junctions and Focal Adhesions ». *Scientific Reports* 6 (octobre): 35956. <https://doi.org/10.1038/srep35956>.
- Campuzano, Victoria, Maria Segura-Puimedon, Verena Terrado, Carolina Sánchez-Rodríguez, Mathilde Coustets, Mauricio Menacho-Márquez, Julián Nevado, Xosé R. Bustelo, Uta Francke, et Luis A. Pérez-Jurado. 2012. « Reduction of NADPH-Oxidase Activity Ameliorates the Cardiovascular Phenotype in a Mouse Model of Williams-Beuren Syndrome ». *PLoS Genetics* 8 (2): e1002458. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002458>.
- Cantor, Jerome O., Bronislava Shteyngart, Joseph M. Cerreta, Shuren Ma, et Gerard M. Turino. 2006. « Synergistic Effect of Hydrogen Peroxide and Elastase on Elastic Fiber Injury in Vitro ». *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* 231 (1): 107-11. <https://doi.org/10.1177/153537020623100113>.
- Carta, Luca, Lygia Pereira, Emilio Arteaga-Solis, Sui Y. Lee-Arteaga, Brett Lenart, Barry Starcher, Christian A. Merkel, et al. 2006. « Fibrillins 1 and 2 Perform Partially Overlapping Functions during Aortic Development ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (12): 8016-23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511599200>.
- Cattell, M. A., J. C. Anderson, et P. S. Hasleton. 1996. « Age-Related Changes in

Amounts and Concentrations of Collagen and Elastin in Normotensive Human Thoracic Aorta ». *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 245 (1): 73-84.

Cavalcante, João L., João A. C. Lima, Alban Redheuil, et Mouaz H. Al-Mallah. 2011. « Aortic Stiffness: Current Understanding and Future Directions ». *Journal of the American College of Cardiology* 57 (14): 1511-22. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.12.017>.

Cenizo, Valérie, Valérie André, Corinne Reymermier, Pascal Sommer, Odile Damour, et Eric Perrier. 2006. « LOXL as a Target to Increase the Elastin Content in Adult Skin: A Dill Extract Induces the LOXL Gene Expression ». *Experimental Dermatology* 15 (8): 574-81. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2006.00442.x>.

Chai, Hao, ZhongHao Tao, Wen Chen, YueYue Xu, Fuhua Huang, CunHua Su, et Xin Chen. 2018. « Cortistatin Attenuates Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm through Inactivation of the ERK1/2 Signaling Pathways ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 495 (2): 1801-6. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.033>.

Chakrabarti, Subhadeep, Jude S. Morton, et Sandra T. Davidge. 2014. « Mechanisms of Estrogen Effects on the Endothelium: An Overview ». *The Canadian Journal of Cardiology* 30 (7): 705-12. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2013.08.006>.

Chakraborti, Sajal, Malay Mandal, Sudip Das, Amritlal Mandal, et Tapati Chakraborti. 2003. « Regulation of Matrix Metalloproteinases: An Overview ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 253 (1-2): 269-85.

Chambliss, Ken L., et Philip W. Shaul. 2002. « Estrogen Modulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase ». *Endocrine Reviews* 23 (5): 665-86. <https://doi.org/10.1210/er.2001-0045>.

Chandra, Aman, Megan Jones, Phillippa Cottrill, Karen Eastlake, G. Astrid Limb, et David G. Charteris. 2013. « Gene Expression and Protein Distribution of ADAMTSL-4 in Human Iris, Choroid and Retina ». *The British Journal of Ophthalmology* 97 (9): 1208-12. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2013-303353>.

« Chapter 7: THE CARDIOVASCULAR SYSTEM: BLOOD VESSELS AND CIRCULATION – Anatomy & Physiology ». s. d. Consulté le 18 mai 2022. <https://qut.pressbooks.pub/anatomyandphysiology/chapter/chapter-20-the-cardiovascular-system-blood-vessels-and-circulation/>.

Chatron-Colliet, Aurore, Nathalie Lalun, Christine Terryn, Sandrine Kurdykowski, Marianne Lorenzato, Anthony Ruscioni, Dominique Ploton, Laurent Duca, et Hélène Bobichon. 2015. « The Elastin Peptide (VGVAPG)<sub>3</sub> Induces the 3D Reorganisation of PML-NBs and SC35 Speckles Architecture, and Accelerates Proliferation of Fibroblasts and Melanoma Cells ». *Histochemistry and Cell Biology* 143 (3): 245-58. <https://doi.org/10.1007/s00418-014-1274-2>.

Chen, Jianshu, Jing Yu, Ruowen Yuan, Ningyin Li, Caie Li, et Xiaofang Zhang. 2021. « mTOR inhibitor improves testosterone-induced myocardial hypertrophy in hypertensive rats ». *The Journal of Endocrinology* 252 (3): 179-93. <https://doi.org/10.1530/JOE-21-0284>.

Chistiakov, Dimitry A., Victor V. Revin, Igor A. Sobenin, Alexander N. Orekhov, et Yuri

- V. Bobryshev. 2015. « Vascular Endothelium: Functioning in Norm, Changes in Atherosclerosis and Current Dietary Approaches to Improve Endothelial Function ». *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 15 (4): 338-50. <https://doi.org/10.2174/1389557515666150226114031>.
- Choi, Jiwon, Andreas Bergdahl, Qian Zheng, Barry Starcher, Hiromi Yanagisawa, et Elaine C. Davis. 2009. « Analysis of Dermal Elastic Fibers in the Absence of Fibulin-5 Reveals Potential Roles for Fibulin-5 in Elastic Fiber Assembly ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 28 (4): 211-20. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2009.03.004>.
- Choi, K. M., H. J. Yoo, H. Y. Kim, K. W. Lee, J. A. Seo, S. G. Kim, N. H. Kim, D. S. Choi, et S. H. Baik. 2009. « Association between Endogenous Secretory RAGE, Inflammatory Markers and Arterial Stiffness ». *International Journal of Cardiology* 132 (1): 96-101. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2007.10.047>.
- Choudhury, Rawshan, Amanda McGovern, Caroline Ridley, Stuart A. Cain, Andrew Baldwin, Ming-Chuan Wang, Chun Guo, et al. 2009. « Differential Regulation of Elastic Fiber Formation by Fibulin-4 and -5 ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (36): 24553-67. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.019364>.
- Chow, Ming-Jay, Raphaël Turcotte, Charles P. Lin, et Yanhang Zhang. 2014. « Arterial Extracellular Matrix: A Mechanobiological Study of the Contributions and Interactions of Elastin and Collagen ». *Biophysical Journal* 106 (12): 2684-92. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.05.014>.
- Cirulis, Judith T., Catherine M. Bellingham, Elaine C. Davis, Dirk Hubmacher, Dieter P. Reinhardt, Robert P. Mecham, et Fred W. Keeley. 2008. « Fibrillins, Fibulins, and Matrix-Associated Glycoprotein Modulate the Kinetics and Morphology of in Vitro Self-Assembly of a Recombinant Elastin-like Polypeptide ». *Biochemistry* 47 (47): 12601-13. <https://doi.org/10.1021/bi8005384>.
- Clark, T. E., M. A. Lillie, A. W. Vogl, J. M. Gosline, et R. E. Shadwick. 2015. « Mechanical Contribution of Lamellar and Interlamellar Elastin along the Mouse Aorta ». *Journal of Biomechanics* 48 (13): 3599-3605. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2015.08.004>.
- Clarke, Adam W., Eva C. Arnsperg, Suzanne M. Mithieux, Emine Korkmaz, Filip Braet, et Anthony S. Weiss. 2006. « Tropoelastin Massively Associates during Coacervation to Form Quantized Protein Spheres ». *Biochemistry* 45 (33): 9989-96. <https://doi.org/10.1021/bi0610092>.
- Cocciolone, Austin J., Jie Z. Hawes, Marius C. Staiculescu, Elizabeth O. Johnson, Monzur Murshed, et Jessica E. Wagenseil. 2018. « Elastin, arterial mechanics, and cardiovascular disease ». *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 315 (2): H189-205. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00087.2018>.
- Coelho, Sónia Gomes, et Ana G. Almeida. 2020. « Marfan Syndrome Revisited: From Genetics to the Clinic ». *Revista Portuguesa De Cardiologia* 39 (4): 215-26. <https://doi.org/10.1016/j.repc.2019.09.008>.
- Collin, S, et B Levy. 2008. « Physiopathologie de l'hyporéactivité Vasculaire Au Cours Des États de Choc ». *Réanimation* 17 (2): 101-10. <https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2007.12.008>.

- Collins Ij, R. Thomas, Margaret G. Collins, Michael L. Schmitz, et Justin T. Hamrick. 2017. « Peri-Procedural Risk Stratification and Management of Patients with Williams Syndrome ». *Congenital Heart Disease* 12 (2): 133-42. <https://doi.org/10.1111/chd.12447>.
- Collins, Jarrod A., Julie-Vanessa Munoz, Toral R. Patel, Marios Loukas, et R. Shane Tubbs. 2014. « The Anatomy of the Aging Aorta ». *Clinical Anatomy (New York, N.Y.)* 27 (3): 463-66. <https://doi.org/10.1002/ca.22384>.
- Collins, R. Thomas. 2011. « Clinical Significance of Prolonged QTc Interval in Williams Syndrome ». *The American Journal of Cardiology* 108 (3): 471-73. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2011.03.071>.
- Collins, R. Thomas, Paige Kaplan, Grant W. Somes, et Jonathan J. Rome. 2010. « Long-Term Outcomes of Patients with Cardiovascular Abnormalities and Williams Syndrome ». *The American Journal of Cardiology* 105 (6): 874-78. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2009.10.069>.
- Cong, Xin, et Wei Kong. 2020. « Endothelial Tight Junctions and Their Regulatory Signaling Pathways in Vascular Homeostasis and Disease ». *Cellular Signalling* 66 (février): 109485. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109485>.
- Coquand-Gandit, Marion, Marie-Paule Jacob, Wassim Fhayli, Beatriz Romero, Miglena Georgieva, Stéphanie Bouillot, Eric Estève, et al. 2017. « Chronic Treatment with Minoxidil Induces Elastic Fiber Neosynthesis and Functional Improvement in the Aorta of Aged Mice ». *Rejuvenation Research* 20 (3): 218-30. <https://doi.org/10.1089/rej.2016.1874>.
- Corson, Glen M, Noe L Charbonneau, Douglas R Keene, et Lynn Y Sakai. 2004. « Differential Expression of Fibrillin-3 Adds to Microfibril Variety in Human and Avian, but Not Rodent, Connective Tissues ». *Genomics* 83 (3): 461-72. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2003.08.023>.
- Cottart, Charles-Henry, Christelle Laguillier, Valérie Nivet-Antoine, Christophe Klimczak, Claude Sebban, et Jean-Louis Beaudeau. 2009. « Biologie du vieillissement artériel et artériosclérose ». *Comptes Rendus Biologies* 332 (5): 433-47. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.10.002>.
- Curran, M. E., D. L. Atkinson, A. K. Ewart, C. A. Morris, M. F. Leppert, et M. T. Keating. 1993. « The Elastin Gene Is Disrupted by a Translocation Associated with Supravalvular Aortic Stenosis ». *Cell* 73 (1): 159-68.
- Czirok, Andras, Julia Zach, Beth A. Kozel, Robert P. Mecham, Elaine C. Davis, et Brenda J. Rongish. 2006. « Elastic Fiber Macro-Assembly Is a Hierarchical, Cell Motion-Mediated Process ». *Journal of Cellular Physiology* 207 (1): 97-106. <https://doi.org/10.1002/jcp.20573>.
- Daamen, Willeke F., et Daniela Quaglino. 2019. « Signaling Pathways in Elastic Tissues ». *Cellular Signalling* 63 (novembre): 109364. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109364>.
- Dagoneau, Nathalie, Catherine Benoist-Lasselin, Céline Huber, Laurence Faivre, André Mégarbané, Abdulrahman Alswaid, Hélène Dollfus, et al. 2004. « ADAMTS10 Mutations in Autosomal Recessive Weill-Marchesani Syndrome ». *American Journal of Human Genetics* 75 (5): 801-6. <https://doi.org/10.1086/425231>.

Danussi, Carla, Lisa Del Bel Belluz, Eliana Pivetta, Teresa Maria Elisa Modica, Andres Muro, Bruna Wassermann, Roberto Doliana, Patrizia Sabatelli, Alfonso Colombatti, et Paola Spessotto. 2013. « EMILIN1/ $\alpha$ 9 $\beta$ 1 Integrin Interaction Is Crucial in Lymphatic Valve Formation and Maintenance ». *Molecular and Cellular Biology* 33 (22): 4381-94. <https://doi.org/10.1128/MCB.00872-13>.

Danussi, Carla, Alessandra Petrucco, Bruna Wassermann, Eliana Pivetta, Teresa Maria Elisa Modica, Lisa Del Bel Belluz, Alfonso Colombatti, et Paola Spessotto. 2011. « EMILIN1- $\alpha$ 4/ $\alpha$ 9 integrin interaction inhibits dermal fibroblast and keratinocyte proliferation ». *Journal of Cell Biology* 195 (1): 131-45. <https://doi.org/10.1083/jcb.201008013>.

Dao, Huy Hao, Rachida Essalihi, Céline Bouvet, et Pierre Moreau. 2005. « Evolution and Modulation of Age-Related Medial Elastocalcinosis: Impact on Large Artery Stiffness and Isolated Systolic Hypertension ». *Cardiovascular Research* 66 (2): 307-17. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.01.012>.

Davidson, J. M., P. A. LuValle, O. Zoia, D. Quaglino, et M. Giro. 1997. « Ascorbate Differentially Regulates Elastin and Collagen Biosynthesis in Vascular Smooth Muscle Cells and Skin Fibroblasts by Pretranslational Mechanisms ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (1): 345-52. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.1.345>.

Davis, E. C. 1993. « Smooth Muscle Cell to Elastic Lamina Connections in Developing Mouse Aorta. Role in Aortic Medial Organization ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 68 (1): 89-99.

Davis, E. C., T. J. Broekelmann, Y. Ozawa, et R. P. Mecham. 1998. « Identification of Tropoelastin as a Ligand for the 65-KD FK506-Binding Protein, FKBP65, in the Secretory Pathway ». *The Journal of Cell Biology* 140 (2): 295-303. <https://doi.org/10.1083/jcb.140.2.295>.

Davis, E. C., et R. P. Mecham. 1998. « Intracellular Trafficking of Tropoelastin ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 17 (4): 245-54. [https://doi.org/10.1016/s0945-053x\(98\)90078-6](https://doi.org/10.1016/s0945-053x(98)90078-6).

DEBRET, Romain, Clément FAYE, Jérôme Sohier, et Pascal Sommer. 2017. Polypeptide derive de la tropoelastine et materiau biocompatible le comprenant. World Intellectual Property Organization WO2017194761A2, filed 12 mai 2017, et issued 16 novembre 2017. <https://patents.google.com/patent/WO2017194761A2/fr>.

Del Campo, Miguel, Anna Antonell, Luis F. Magano, Francisco J. Muñoz, Raquel Flores, Mònica Bayés, et Luis A. Pérez Jurado. 2006. « Hemizygoty at the NCF1 Gene in Patients with Williams-Beuren Syndrome Decreases Their Risk of Hypertension ». *American Journal of Human Genetics* 78 (4): 533-42. <https://doi.org/10.1086/501073>.

Delevoeye, Cédric, Michael S. Marks, et Graça Raposo. 2019. « Lysosome-Related Organelles as Functional Adaptations of the Endolysosomal System ». *Current Opinion in Cell Biology* 59 (août): 147-58. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.05.003>.

Della Corte, Alessandro, Cesare Quarto, Ciro Bancone, Clotilde Castaldo, Franca Di Meglio, Daria Nurzynska, Luca S. De Santo, et al. 2008. « Spatiotemporal Patterns of Smooth Muscle Cell Changes in Ascending Aortic Dilatation with Bicuspid and Tricuspid Aortic Valve Stenosis: Focus on Cell-Matrix Signaling ». *The Journal of*

*Thoracic and Cardiovascular Surgery* 135 (1): 8-18, 18.e1-2.  
<https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2007.09.009>.

Dematteis, Maurice, Diane Godin-Ribuot, Claire Arnaud, Christophe Ribuot, Françoise Stanke-Labesque, Jean-Louis Pépin, et Patrick Lévy. 2009. « Cardiovascular Consequences of Sleep-Disordered Breathing: Contribution of Animal Models to Understanding the Human Disease ». *ILAR Journal* 50 (3): 262-81.  
<https://doi.org/10.1093/ilar.50.3.262>.

Destors, Marie, Renaud Tamisier, Louis-Marie Galerneau, Patrick Lévy, et Jean-Louis Pepin. 2017. « [Pathophysiology of obstructive sleep apnea syndrome and its cardiometabolic consequences] ». *Presse Medicale (Paris, France: 1983)* 46 (4): 395-403. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2016.09.008>.

Devy, J., L. Duca, B. Cantarelli, D. Joseph-Pietras, A. Scandolera, A. Rusciani, L. Parent, et al. 2010. « Elastin-Derived Peptides Enhance Melanoma Growth in Vivo by Upregulating the Activation of Mcol-A (MMP-1) Collagenase ». *British Journal of Cancer* 103 (10): 1562-70. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605926>.

Dingemans, K. P., P. Teeling, J. H. Lagendijk, et A. E. Becker. 2000. « Extracellular Matrix of the Human Aortic Media: An Ultrastructural Histochemical and Immunohistochemical Study of the Adult Aortic Media ». *The Anatomical Record* 258 (1): 1-14. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(20000101\)258:1<1::AID-AR1>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(20000101)258:1<1::AID-AR1>3.0.CO;2-7).

Dobrin, P. B., et A. A. Rovick. 1969. « Influence of Vascular Smooth Muscle on Contractile Mechanics and Elasticity of Arteries ». *The American Journal of Physiology* 217 (6): 1644-51. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1969.217.6.1644>.

Doué, Manon, Anaïs Okwieka, Alexandre Berquand, Laëtitia Gorisse, Pascal Maurice, Frédéric Velard, Christine Terryn, et al. 2021. « Carbamylation of Elastic Fibers Is a Molecular Substratum of Aortic Stiffness ». *Scientific Reports* 11 (1): 17827. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97293-5>.

Drager, Luciano F., Luiz A. Bortolotto, Maria Cecília Lorenzi, Adelaide C. Figueiredo, Eduardo M. Krieger, et Geraldo Lorenzi-Filho. 2005. « Early Signs of Atherosclerosis in Obstructive Sleep Apnea ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 172 (5): 613-18. <https://doi.org/10.1164/rccm.200503-340OC>.

Drager, Luciano F., R. Doug McEvoy, Ferran Barbe, Geraldo Lorenzi-Filho, Susan Redline, et INCOSACT Initiative (International Collaboration of Sleep Apnea Cardiovascular Trialists). 2017. « Sleep Apnea and Cardiovascular Disease: Lessons From Recent Trials and Need for Team Science ». *Circulation* 136 (19): 1840-50. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029400>.

Drager, Luciano F., Qiaoling Yao, Karen L. Hernandez, Mi-Kyung Shin, Shannon Bevans-Fonti, Jason Gay, Thomas E. Sussan, et al. 2013. « Chronic Intermittent Hypoxia Induces Atherosclerosis via Activation of Adipose Angiopoietin-like 4 ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 188 (2): 240-48. <https://doi.org/10.1164/rccm.201209-1688OC>.

Du, Qiu, Dingding Zhang, Yue Zhuang, Qiongrong Xia, Taishen Wen, et Haiping Jia. 2021. « The Molecular Genetics of Marfan Syndrome ». *International Journal of Medical Sciences* 18 (13): 2752-66. <https://doi.org/10.7150/ijms.60685>.

- Dubick, Michael A., Robert B. Rucker, Carroll E. Cross, et Jerold A. Last. 1981. « Elastin Metabolism in Rodent Lung ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 672 (3): 303-6. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(81\)90297-X](https://doi.org/10.1016/0304-4165(81)90297-X).
- Duca, Laurent, Sébastien Blaise, Béatrice Romier, Muriel Laffargue, Stéphanie Gayral, Hassan El Btaouri, Charlotte Kawecki, et al. 2016. « Matrix ageing and vascular impacts: focus on elastin fragmentation ». *Cardiovascular Research* 110 (3): 298-308. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvw061>.
- Duca, Laurent, Charlotte Blanchevoye, Benoît Cantarelli, Christelle Ghoneim, Stéphane Dedieu, Frédéric Delacoux, William Hornebeck, Aleksander Hinek, Laurent Martiny, et Laurent Debelle. 2007. « The Elastin Receptor Complex Transduces Signals through the Catalytic Activity of Its Neu-1 Subunit ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (17): 12484-91. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609505200>.
- Duca, Laurent, Nicolas Floquet, Alain J. P. Alix, Bernard Haye, et Laurent Debelle. 2004. « Elastin as a Matrikine ». *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 49 (3): 235-44. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2003.09.007>.
- Duca, Laurent, Elise Lambert, Romain Debret, Bernard Rothhut, Charlotte Blanchevoye, Frédéric Delacoux, William Hornebeck, Laurent Martiny, et Laurent Debelle. 2005. « Elastin Peptides Activate Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 via a Ras-Independent Mechanism Requiring Both P110gamma/Raf-1 and Protein Kinase A/B-Raf Signaling in Human Skin Fibroblasts ». *Molecular Pharmacology* 67 (4): 1315-24. <https://doi.org/10.1124/mol.104.002725>.
- Duque Lasio, Maria Laura, et Beth A. Kozel. 2018. « Elastin-Driven Genetic Diseases ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 71-72 (octobre): 144-60. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.02.021>.
- Durán, J., S. Esnaola, R. Rubio, et A. Iztueta. 2001. « Obstructive Sleep Apnea-Hypopnea and Related Clinical Features in a Population-Based Sample of Subjects Aged 30 to 70 Yr ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 163 (3 Pt 1): 685-89. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.3.2005065>.
- Dyksterhuis, L. B., C. Baldock, D. Lammie, T. J. Wess, et A. S. Weiss. 2007. « Domains 17-27 of Tropoelastin Contain Key Regions of Contact for Coacervation and Contain an Unusual Turn-Containing Crosslinking Domain ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 26 (2): 125-35. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2006.10.002>.
- El Assar, Mariam, Javier Angulo, et Leocadio Rodríguez-Mañas. 2013. « Oxidative Stress and Vascular Inflammation in Aging ». *Free Radical Biology & Medicine* 65 (décembre): 380-401. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.003>.
- El-Hallous, Ehab, Takako Sasaki, Dirk Hubmacher, Melkamu Getie, Kerstin Tiedemann, Jürgen Brinckmann, Boris Bätge, Elaine C. Davis, et Dieter P. Reinhardt. 2007. « Fibrillin-1 Interactions with Fibulins Depend on the First Hybrid Domain and Provide an Adaptor Function to Tropoelastin ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (12): 8935-46. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608204200>.
- Elliott, Morgan B., et Sharon Gerecht. 2016. « Three-Dimensional Culture of Small-Diameter Vascular Grafts ». *Journal of Materials Chemistry B* 4 (20): 3443-53. <https://doi.org/10.1039/C6TB00024J>.

- Erusalimsky, Jorge D. 2009. « Vascular Endothelial Senescence: From Mechanisms to Pathophysiology ». *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 106 (1): 326-32. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.91353.2008>.
- Ewart, A. K., C. A. Morris, D. Atkinson, W. Jin, K. Sternes, P. Spallone, A. D. Stock, M. Leppert, et M. T. Keating. 1993. « Hemizygoty at the Elastin Locus in a Developmental Disorder, Williams Syndrome ». *Nature Genetics* 5 (1): 11-16. <https://doi.org/10.1038/ng0993-11>.
- Fahem, A., A. Robinet, J. H. Cauchard, L. Duca, M. Soula-Rothhut, B. Rothhut, C. Soria, M. Guenounou, W. Hornebeck, et G. Bellon. 2008. « Elastokine-Mediated up-Regulation of MT1-MMP Is Triggered by Nitric Oxide in Endothelial Cells ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40 (8): 1581-96. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.11.022>.
- Faury, G. 1998. « Role of the Elastin-Laminin Receptor in the Cardiovascular System ». *Pathologie-Biologie* 46 (7): 517-26.
- Faury, G. 2001a. « [Role of elastin in the development of vascular function. Knock-out study of the elastin gene in mice ». *Journal de la Societe de biologie* 195 (2): 151-56.
- Faury, G. 2001b. « Function-Structure Relationship of Elastic Arteries in Evolution: From Microfibrils to Elastin and Elastic Fibres ». *Pathologie-Biologie* 49 (4): 310-25.
- Faury, G., A. Chabaud, M. T. Ristori, L. Robert, et J. Verdetti. 1997. « Effect of Age on the Vasodilatory Action of Elastin Peptides ». *Mechanisms of Ageing and Development* 95 (1-2): 31-42.
- Faury, G., S. Garnier, A. S. Weiss, J. Wallach, T. Fülöp, M. P. Jacob, R. P. Mecham, L. Robert, et J. Verdetti. 1998. « Action of Tropoelastin and Synthetic Elastin Sequences on Vascular Tone and on Free Ca<sup>2+</sup> Level in Human Vascular Endothelial Cells ». *Circulation Research* 82 (3): 328-36.
- Faury, G., G. M. Maher, D. Y. Li, M. T. Keating, R. P. Mecham, et W. A. Boyle. 1999. « Relation between Outer and Luminal Diameter in Cannulated Arteries ». *The American Journal of Physiology* 277 (5): H1745-1753. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1999.277.5.H1745>.
- Faury, G., M. T. Ristori, J. Verdetti, M. P. Jacob, et L. Robert. 1994. « [Role of the elastin-laminin receptor in the vasoregulation] ». *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie* 317 (9): 807-11.
- Faury, G., M. T. Ristori, J. Verdetti, M. P. Jacob, et L. Robert. 1995. « Effect of Elastin Peptides on Vascular Tone ». *Journal of Vascular Research* 32 (2): 112-19. <https://doi.org/10.1159/000159084>.
- Faury, G., Y. Usson, M. Robert-Nicoud, L. Robert, et J. Verdetti. 1998. « Nuclear and Cytoplasmic Free Calcium Level Changes Induced by Elastin Peptides in Human Endothelial Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (6): 2967-72.
- Faury, Gilles, Mylène Pezet, Russell H. Knutsen, Walter A. Boyle, Scott P. Heximer, Sean E. McLean, Robert K. Minkes, et al. 2003. « Developmental Adaptation of the Mouse Cardiovascular System to Elastin Haploinsufficiency ». *The Journal of Clinical Investigation* 112 (9): 1419-28. <https://doi.org/10.1172/JCI19028>.

Fels, Johannes, Pia Jeggle, Ivan Liashkovich, Wladimir Peters, et Hans Oberleithner. 2014. « Nanomechanics of Vascular Endothelium ». *Cell and Tissue Research* 355 (3): 727-37. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1853-5>.

Fhayli, W., M. Boyer, Z. Ghandour, M. P. Jacob, J. P. Andrieu, B. C. Starcher, E. Estève, et G. Faury. 2019. « Chronic Administration of Minoxidil Protects Elastic Fibers and Stimulates Their Neosynthesis with Improvement of the Aorta Mechanics in Mice ». *Cellular Signalling* 62 (octobre): 109333. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.05.018>.

Fhayli, Wassim, Quentin Boëté, Olfa Harki, Anne Briançon-Marjollet, Marie-Paule Jacob, et Gilles Faury. 2019a. « Rise and Fall of Elastic Fibers from Development to Aging. Consequences on Arterial Structure-Function and Therapeutical Perspectives ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, septembre. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2019.08.005>.

Fhayli, Wassim, Quentin Boëté, Nadjib Kihal, Valérie Cenizo, Pascal Sommer, Walter A. Boyle, Marie-Paule Jacob, et Gilles Faury. 2020. « Dill Extract Induces Elastic Fiber Neosynthesis and Functional Improvement in the Ascending Aorta of Aged Mice with Reversal of Age-Dependent Cardiac Hypertrophy and Involvement of Lysyl Oxidase-Like-1 ». *Biomolecules* 10 (2): E173. <https://doi.org/10.3390/biom10020173>.

Fletcher, E. C., J. Lesske, J. Culman, C. C. Miller, et T. Unger. 1992. « Sympathetic Denervation Blocks Blood Pressure Elevation in Episodic Hypoxia ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 20 (5): 612-19. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.20.5.612>.

Fonta, Charlotte M., Simon Arnoldini, Daniela Jaramillo, Alessandra Moscaroli, Annette Oxenius, Martin Behe, et Viola Vogel. 2020. « Fibronectin Fibers Are Highly Tensed in Healthy Organs in Contrast to Tumors and Virus-Infected Lymph Nodes ». *Matrix Biology Plus* 8 (novembre): 100046. <https://doi.org/10.1016/j.mbplus.2020.100046>.

Franceschi, Claudio, Miriam Capri, Daniela Monti, Sergio Giunta, Fabiola Olivieri, Federica Sevini, Maria Panagiota Panourgia, et al. 2007. « Inflammaging and Anti-Inflammaging: A Systemic Perspective on Aging and Longevity Emerged from Studies in Humans ». *Mechanisms of Ageing and Development* 128 (1): 92-105. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.11.016>.

Fujikawa, Yusuke, Hideyuki Yoshida, Tadashi Inoue, Tetsuya Ohbayashi, Kazuo Noda, Harald von Melchner, Toshiji Iwasaka, Ichiro Shiojima, Tomoya O. Akama, et Tomoyuki Nakamura. 2017. « Latent TGF- $\beta$  Binding Protein 2 and 4 Have Essential Overlapping Functions in Microfibril Development ». *Scientific Reports* 7 (mars): 43714. <https://doi.org/10.1038/srep43714>.

Fulop, T., A. Khalil, et A. Larbi. 2012. « The Role of Elastin Peptides in Modulating the Immune Response in Aging and Age-Related Diseases ». *Pathologie-Biologie* 60 (1): 28-33. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2011.10.006>.

Fulop, Tamas, Anis Larbi, Axelle Fortun, Ladislav Robert, et Abdelouahed Khalil. 2005. « Elastin Peptides Induced Oxidation of LDL by Phagocytic Cells ». *Pathologie-Biologie* 53 (7): 416-23. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2004.12.023>.

Gabriel, Luis A. R., Lauren W. Wang, Hannah Bader, Jason C. Ho, Alana K. Majors, Joe G. Hollyfield, Elias I. Traboulsi, et Suneel S. Apte. 2012. « ADAMTSL4, a Secreted Glycoprotein Widely Distributed in the Eye, Binds Fibrillin-1 Microfibrils and

Accelerates Microfibril Biogenesis ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53 (1): 461-69. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5955>.

Gabriela Espinosa, M., William S. Gardner, Lisa Bennett, Bradley A. Sather, Hiromi Yanagisawa, et Jessica E. Wagenseil. 2014. « The Effects of Elastic Fiber Protein Insufficiency and Treatment on the Modulus of Arterial Smooth Muscle Cells ». *Journal of Biomechanical Engineering* 136 (2): 0210301-7. <https://doi.org/10.1115/1.4026203>.

Gargiulo, Simona, Paola Gamba, Giuseppe Poli, et Gabriella Leonarduzzi. 2014. « Metalloproteinases and Metalloproteinase Inhibitors in Age-Related Diseases ». *Current Pharmaceutical Design* 20 (18): 2993-3018. <https://doi.org/10.2174/13816128113196660701>.

Gayral, Stephanie, Roselyne Garnotel, Audrey Castaing-Berthou, Sebastien Blaise, Anne Fougerat, Elodie Berge, Aurelie Montheil, et al. 2014. « Elastin-derived peptides potentiate atherosclerosis through the immune Neu1–PI3Ky pathway ». *Cardiovascular Research* 102 (1): 118-27. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt336>.

GBD 2017 Causes of Death Collaborators. 2018. « Global, Regional, and National Age-Sex-Specific Mortality for 282 Causes of Death in 195 Countries and Territories, 1980-2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 ». *Lancet (London, England)* 392 (10159): 1736-88. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32203-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32203-7).

GBD 2017 Risk Factor Collaborators. 2018. « Global, Regional, and National Comparative Risk Assessment of 84 Behavioural, Environmental and Occupational, and Metabolic Risks or Clusters of Risks for 195 Countries and Territories, 1990-2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 ». *Lancet (London, England)* 392 (10159): 1923-94. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32225-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32225-6).

Ge, Xin, Yongming Ren, Oscar Bartulos, Min Young Lee, Zhichao Yue, Kun-Yong Kim, Wei Li, et al. 2012. « Modeling Supravalvular Aortic Stenosis Syndrome with Human Induced Pluripotent Stem Cells ». *Circulation* 126 (14): 1695-1704. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.116996>.

Ghuysen-Itard, A. F., L. Robert, et M. P. Jacob. 1992. « [Effect of elastin peptides on cell proliferation] ». *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie* 315 (12): 473-78.

Giannotti, Gianna, et Ulf Landmesser. 2007. « Endothelial Dysfunction as an Early Sign of Atherosclerosis ». *Herz* 32 (7): 568-72. <https://doi.org/10.1007/s00059-007-3073-1>.

Gibbons, C. A., et R. E. Shadwick. 1989. « Functional Similarities in the Mechanical Design of the Aorta in Lower Vertebrates and Mammals ». *Experientia* 45 (11-12): 1083-88. <https://doi.org/10.1007/BF01950164>.

Giro, M. G., K. E. Hill, L. B. Sandberg, et J. M. Davidson. 1984. « Quantitation of Elastin Production in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells by a Sensitive and Specific Enzyme-Linked Immunoassay ». *Collagen and Related Research* 4 (1): 21-34. [https://doi.org/10.1016/s0174-173x\(84\)80026-6](https://doi.org/10.1016/s0174-173x(84)80026-6).

Giudici, Alessandro, Ian B. Wilkinson, et Ashraf W. Khir. 2021. « Review of the Techniques Used for Investigating the Role Elastin and Collagen Play in Arterial Wall Mechanics ». *IEEE Reviews in Biomedical Engineering* 14: 256-69.

<https://doi.org/10.1109/RBME.2020.3005448>.

Godwin, Alan R. F., Mukti Singh, Michael P. Lockhart-Cairns, Yasmene F. Alanazi, Stuart A. Cain, et Clair Baldock. 2019. « The Role of Fibrillin and Microfibril Binding Proteins in Elastin and Elastic Fibre Assembly ». *Matrix Biology* 84 (novembre): 17-30. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2019.06.006>.

González, Arantxa, Begoña López, Susana Ravassa, Gorka San José, et Javier Díez. 2019. « The Complex Dynamics of Myocardial Interstitial Fibrosis in Heart Failure. Focus on Collagen Cross-Linking ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research* 1866 (9): 1421-32. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.06.001>.

Gonzalez de Torre, Israel, Matilde Alonso, et Jose-Carlos Rodriguez-Cabello. 2020. « Elastin-Based Materials: Promising Candidates for Cardiac Tissue Regeneration ». *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8: 657. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00657>.

Goodarzi, Mohammad Taghi, Iraj Khodadadi, Heidar Tavilani, et Ebrahim Abbasi Oshaghi. 2016. « The Role of Anethum graveolens L. (Dill) in the Management of Diabetes ». *Journal of Tropical Medicine* 2016: 1098916. <https://doi.org/10.1155/2016/1098916>.

Gorisse, Laëtitia, Christine Pietrement, Vincent Vuiblet, Christian E. H. Schmelzer, Martin Köhler, Laurent Duca, Laurent Debelle, Paul Fornès, Stéphane Jaisson, et Philippe Gillery. 2016. « Protein Carbamylation Is a Hallmark of Aging ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (5): 1191-96. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517096113>.

Grant, D. S., K. Tashiro, B. Segui-Real, Y. Yamada, G. R. Martin, et H. K. Kleinman. 1989. « Two Different Laminin Domains Mediate the Differentiation of Human Endothelial Cells into Capillary-like Structures in Vitro ». *Cell* 58 (5): 933-43. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90945-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90945-8).

Gras, Emmanuelle, Elise Belaidi, Anne Briançon-Marjollet, Jean-Louis Pépin, Claire Arnaud, et Diane Godin-Ribuot. 2016. « Endothelin-1 Mediates Intermittent Hypoxia-Induced Inflammatory Vascular Remodeling through HIF-1 Activation ». *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 120 (4): 437-43. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00641.2015>.

Greenwald, S. E. 2007. « Ageing of the Conduit Arteries ». *The Journal of Pathology* 211 (2): 157-72. <https://doi.org/10.1002/path.2101>.

Gruber, Hans-Jürgen, Maria Donatella Semeraro, Wilfried Renner, et Markus Herrmann. 2021. « Telomeres and Age-Related Diseases ». *Biomedicines* 9 (10): 1335. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9101335>.

Gu, Qi, Bing Wang, Xiao-Feng Zhang, Yan-Ping Ma, Jian-Dong Liu, et Xiao-Ze Wang. 2014. « Contribution of Receptor for Advanced Glycation End Products to Vasculature-Protecting Effects of Exercise Training in Aged Rats ». *European Journal of Pharmacology* 741 (octobre): 186-94. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.08.017>.

Guo, Gao, Begoña Muñoz-García, Claus-Eric Ott, Johannes Grünhagen, Shaaban A. Mousa, Angelika Pletschacher, Yskert von Kodolitsch, Petra Knaus, et Peter N. Robinson. 2013. « Antagonism of GxxPG fragments ameliorates manifestations of aortic disease in Marfan syndrome mice ». *Human Molecular Genetics* 22 (3): 433-43.

<https://doi.org/10.1093/hmg/dds439>.

Gürgen, Dennis, Angelika Kusch, Robin Klewitz, Uwe Hoff, Rusan Catar, Björn Hegner, Ulrich Kintscher, Friedrich C. Luft, et Duska Dragun. 2013. « Sex-Specific MTOR Signaling Determines Sexual Dimorphism in Myocardial Adaptation in Normotensive DOCA-Salt Model ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 61 (3): 730-36. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00276>.

Guzik, Tomasz J., et Rhian M. Touyz. 2017. « Oxidative Stress, Inflammation, and Vascular Aging in Hypertension ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 70 (4): 660-67. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.07802>.

Habashi, Jennifer P., Daniel P. Judge, Tammy M. Holm, Ronald D. Cohn, Bart L. Loeys, Timothy K. Cooper, Loretha Myers, et al. 2006. « Losartan, an AT1 Antagonist, Prevents Aortic Aneurysm in a Mouse Model of Marfan Syndrome ». *Science (New York, N.Y.)* 312 (5770): 117-21. <https://doi.org/10.1126/science.1124287>.

Hadj-Rabia, Smail, Bert L. Callewaert, Emmanuelle Bourrat, Marlies Kempers, Astrid S. Plomp, Valerie Layet, Deborah Bartholdi, et al. 2013. « Twenty Patients Including 7 Proband with Autosomal Dominant Cutis Laxa Confirm Clinical and Molecular Homogeneity ». *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8 (février): 36. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-36>.

Haji-Seyed-Javadi, Ramona, Sahar Jelodari-Mamaghani, Seyed Hassan Paylakhi, Shahin Yazdani, Naveed Nilforushan, Jian-Bing Fan, Brandy Klotzle, et al. 2012. « LTBP2 Mutations Cause Weill-Marchesani and Weill-Marchesani-like Syndrome and Affect Disruptions in the Extracellular Matrix ». *Human Mutation* 33 (8): 1182-87. <https://doi.org/10.1002/humu.22105>.

Halabi, Carmen M., Thomas J. Broekelmann, Russell H. Knutsen, Li Ye, Robert P. Mecham, et Beth A. Kozel. 2015. « Chronic Antihypertensive Treatment Improves Pulse Pressure but Not Large Artery Mechanics in a Mouse Model of Congenital Vascular Stiffness ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 309 (5): H1008-1016. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00288.2015>.

Halabi, Carmen M., Thomas J. Broekelmann, Michelle Lin, Vivian S. Lee, Mon-Li Chu, et Robert P. Mecham. 2017. « Fibulin-4 is essential for maintaining arterial wall integrity in conduit but not muscular arteries ». *Science Advances* 3 (5): e1602532. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1602532>.

Halabi, Carmen M., et Beth A. Kozel. 2020. « Vascular elastic fiber heterogeneity in health and disease ». *Current opinion in hematology* 27 (3): 190-96. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000578>.

Hamidi, Hellyeh, et Johanna Ivaska. 2018. « Every Step of the Way: Integrins in Cancer Progression and Metastasis ». *Nature Reviews. Cancer* 18 (9): 533-48. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0038-z>.

Harki, Olfa, Quentin Boete, Jean-Louis Pépin, Claire Arnaud, Elise Belaidi, Gilles Fauray, Charles Khouri, et Anne Briançon-Marjollet. 2022. « Intermittent Hypoxia-Related Alterations in Vascular Structure and Function: A Systematic Review and Meta-Analysis of Rodent Data ». *The European Respiratory Journal* 59 (3): 2100866. <https://doi.org/10.1183/13993003.00866-2021>.

Havelka, George E., et Melina R. Kibbe. 2011. « The Vascular Adventitia: Its Role in

the Arterial Injury Response ». *Vascular and Endovascular Surgery* 45 (5): 381-90. <https://doi.org/10.1177/1538574411407698>.

Hawes, Jie Z., Austin J. Cocciolone, Amy H. Cui, Diana B. Griffin, Marius Catalin Staiculescu, Robert P. Mecham, et Jessica E. Wagenseil. 2020. « Elastin haploinsufficiency in mice has divergent effects on arterial remodeling with aging depending on sex ». *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 319 (6): H1398-1408. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00517.2020>.

Hayashi, A., T. Suzuki, H. Wachi, S. Tajima, T. Nishikawa, S. Murad, et S. R. Pinnell. 1994. « Minoxidil Stimulates Elastin Expression in Aortic Smooth Muscle Cells ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 315 (1): 137-41. <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1482>.

Hayashi, Toshio, Hisako Matsui-Hirai, Asaka Miyazaki-Akita, Akiko Fukatsu, Jun Funami, Qun-Fang Ding, Sumitra Kamalanathan, Yuichi Hattori, Louis J. Ignarro, et Akihisa Iguchi. 2006. « Endothelial Cellular Senescence Is Inhibited by Nitric Oxide: Implications in Atherosclerosis Associated with Menopause and Diabetes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (45): 17018-23. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607873103>.

Haycock, Philip C., Emma E. Heydon, Stephen Kaptoge, Adam S. Butterworth, Alex Thompson, et Peter Willeit. 2014. « Leucocyte Telomere Length and Risk of Cardiovascular Disease: Systematic Review and Meta-Analysis ». *BMJ (Clinical Research Ed.)* 349 (juillet): g4227. <https://doi.org/10.1136/bmj.g4227>.

Hedtke, Tobias, Christoph U. Schröder, Andrea Heinz, Wolfgang Hoehenwarter, Jürgen Brinckmann, Thomas Groth, et Christian E. H. Schmelzer. 2019. « A Comprehensive Map of Human Elastin Cross-Linking during Elastogenesis ». *The FEBS Journal* 286 (18): 3594-3610. <https://doi.org/10.1111/febs.14929>.

Heinz, Andrea. 2021. « Elastic Fibers during Aging and Disease ». *Ageing Research Reviews* 66 (mars): 101255. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101255>.

Hellenthal, Femke A. M. V. I., Willem A. Buurman, Will K. W. H. Wodzig, et Geert Willem H. Schurink. 2009. « Biomarkers of AAA Progression. Part 1: Extracellular Matrix Degeneration ». *Nature Reviews. Cardiology* 6 (7): 464-74. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2009.80>.

Henwood, Tony. 1983. « Shikata's Orcein Stain - A Routine Stain for Liver Biopsies ». *Australian Journal of Medical Laboratory Science* 4 (mai): 76-80.

Herrmann, Markus, Irene Pusceddu, Winfried März, et Wolfgang Herrmann. 2018. « Telomere Biology and Age-Related Diseases ». *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 56 (8): 1210-22. <https://doi.org/10.1515/cclm-2017-0870>.

Hinek, A., F. W. Keeley, et J. Callahan. 1995. « Recycling of the 67-KDa Elastin Binding Protein in Arterial Myocytes Is Imperative for Secretion of Tropoelastin ». *Experimental Cell Research* 220 (2): 312-24. <https://doi.org/10.1006/excr.1995.1321>.

Hinek, A., M. Rabinovitch, F. Keeley, Y. Okamura-Oho, et J. Callahan. 1993. « The 67-KD Elastin/Laminin-Binding Protein Is Related to an Enzymatically Inactive, Alternatively Spliced Form of Beta-Galactosidase ». *The Journal of Clinical Investigation* 91 (3): 1198-1205. <https://doi.org/10.1172/JCI116280>.

Hinek, A., D. S. Wrenn, R. P. Mecham, et S. H. Barondes. 1988. « The Elastin

Receptor: A Galactoside-Binding Protein ». *Science (New York, N.Y.)* 239 (4847): 1539-41. <https://doi.org/10.1126/science.2832941>.

Hinek, Aleksander, Tetyana D. Bodnaruk, Severa Bunda, Yanting Wang, et Kela Liu. 2008. « Neuraminidase-1, a Subunit of the Cell Surface Elastin Receptor, Desialylates and Functionally Inactivates Adjacent Receptors Interacting with the Mitogenic Growth Factors PDGF-BB and IGF-2 ». *The American Journal of Pathology* 173 (4): 1042-56. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.071081>.

Hinek, Aleksander, Alexey V. Pshezhetsky, Mark von Itzstein, et Barry Starcher. 2006. « Lysosomal Sialidase (Neuraminidase-1) Is Targeted to the Cell Surface in a Multiprotein Complex That Facilitates Elastic Fiber Assembly\* ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (6): 3698-3710. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508736200>.

Hirai, Maretoshi, Masahito Horiguchi, Tetsuya Ohbayashi, Toru Kita, Kenneth R. Chien, et Tomoyuki Nakamura. 2007. « Latent TGF-Beta-Binding Protein 2 Binds to DANCE/Fibulin-5 and Regulates Elastic Fiber Assembly ». *The EMBO Journal* 26 (14): 3283-95. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601768>.

Hirai, Maretoshi, Tetsuya Ohbayashi, Masahito Horiguchi, Katsuya Okawa, Akari Hagiwara, Kenneth R. Chien, Toru Kita, et Tomoyuki Nakamura. 2007. « Fibulin-5/DANCE Has an Elastogenic Organizer Activity That Is Abrogated by Proteolytic Cleavage in Vivo ». *The Journal of Cell Biology* 176 (7): 1061-71. <https://doi.org/10.1083/jcb.200611026>.

Hirano, Eiichi, Russell H. Knutsen, Hideki Sugitani, Christopher H. Ciliberto, et Robert P. Mecham. 2007. « Functional Rescue of Elastin Insufficiency in Mice by the Human Elastin Gene: Implications for Mouse Models of Human Disease ». *Circulation Research* 101 (5): 523-31. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.153510>.

Hoffmann, Jędrzej, Gavin Richardson, Judith Haendeler, Joachim Altschmied, Vicente Andrés, et Ioakim Spyridopoulos. 2021. « Telomerase as a Therapeutic Target in Cardiovascular Disease ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 41 (3): 1047-61. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.315695>.

Holmberg, Johan, et Madeleine Durbeej. 2013. « Laminin-211 in Skeletal Muscle Function ». *Cell Adhesion & Migration* 7 (1): 111-21. <https://doi.org/10.4161/cam.22618>.

Hoogeveen, A. T., F. W. Verheijen, et H. Galjaard. 1983. « The Relation between Human Lysosomal Beta-Galactosidase and Its Protective Protein ». *The Journal of Biological Chemistry* 258 (20): 12143-46.

Hooijmans, Carlijn R., Maroeska M. Rovers, Rob B. M. de Vries, Marlies Leenaars, Merel Ritskes-Hoitinga, et Miranda W. Langendam. 2014. « SYRCLE's Risk of Bias Tool for Animal Studies ». *BMC Medical Research Methodology* 14 (mars): 43. <https://doi.org/10.1186/1471-2288-14-43>.

Horiguchi, Masahito, Tadashi Inoue, Tetsuya Ohbayashi, Maretoshi Hirai, Kazuo Noda, Lihua Y. Marmorstein, Daisuke Yabe, et al. 2009. « Fibulin-4 Conducts Proper Elastogenesis via Interaction with Cross-Linking Enzyme Lysyl Oxidase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (45): 19029-34. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908268106>.

Hornstra, Ian K., Shonyale Birge, Barry Starcher, Allen J. Bailey, Robert P. Mecham,

et Steven D. Shapiro. 2003. « Lysyl Oxidase Is Required for Vascular and Diaphragmatic Development in Mice ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (16): 14387-93. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210144200>.

Horton, Edward R., Adam Byron, Janet A. Askari, Daniel H. J. Ng, Angélique Millon-Frémillon, Joseph Robertson, Ewa J. Koper, et al. 2015. « Definition of a Consensus Integrin Adhesome and Its Dynamics during Adhesion Complex Assembly and Disassembly ». *Nature Cell Biology* 17 (12): 1577-87. <https://doi.org/10.1038/ncb3257>.

Howard, P. S., et E. J. Macarak. 1989. « Localization of Collagen Types in Regional Segments of the Fetal Bovine Aorta ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 61 (5): 548-55.

Hoyos, Camilla M., Kerri L. Melehan, Peter Y. Liu, Ronald R. Grunstein, et Craig L. Phillips. 2015. « Does Obstructive Sleep Apnea Cause Endothelial Dysfunction? A Critical Review of the Literature ». *Sleep Medicine Reviews* 20 (avril): 15-26. <https://doi.org/10.1016/j.smrv.2014.06.003>.

Hubmacher, Dirk, et Suneel S. Apte. 2015. « ADAMTS proteins as modulators of microfibril formation and function ». *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 47 (septembre): 34-43. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.05.004>.

Hubmacher, Dirk, Ehab I. El-Hallous, Valentin Nelea, Mari T. Kaartinen, Eunice R. Lee, et Dieter P. Reinhardt. 2008. « Biogenesis of extracellular microfibrils: Multimerization of the fibrillin-1 C terminus into bead-like structures enables self-assembly ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (18): 6548-53. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706335105>.

Hubmacher, Dirk, Lauren W. Wang, Robert P. Mecham, Dieter P. Reinhardt, et Suneel S. Apte. 2015. « Adamtsl2 Deletion Results in Bronchial Fibrillin Microfibril Accumulation and Bronchial Epithelial Dysplasia--a Novel Mouse Model Providing Insights into Geleophysic Dysplasia ». *Disease Models & Mechanisms* 8 (5): 487-99. <https://doi.org/10.1242/dmm.017046>.

Huchtagowder, Vishwanathan, Eva Morava, Uwe Kornak, Dirk J. Lefeber, Björn Fischer, Aikaterini Dimopoulou, Annika Aldinger, et al. 2009. « Loss-of-Function Mutations in ATP6V0A2 Impair Vesicular Trafficking, Tropoelastin Secretion and Cell Survival ». *Human Molecular Genetics* 18 (12): 2149-65. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp148>.

Huchtagowder, Vishwanathan, Nina Sausgruber, Katherine H. Kim, Brad Angle, Lihua Y. Marmorstein, et Zsolt Urban. 2006. « Fibulin-4: A Novel Gene for an Autosomal Recessive Cutis Laxa Syndrome ». *American Journal of Human Genetics* 78 (6): 1075-80. <https://doi.org/10.1086/504304>.

Huet, Eric, Bertrand Brassart, Jean-Hubert Cauchard, Laurent Debelle, Philippe Birembaut, Jean Wallach, Herve Emonard, Myriam Polette, et William Hornebeck. 2002. « Cumulative Influence of Elastin Peptides and Plasminogen on Matrix Metalloproteinase Activation and Type I Collagen Invasion by HT-1080 Fibrosarcoma Cells ». *Clinical & Experimental Metastasis* 19 (2): 107-17. <https://doi.org/10.1023/a:1014547324918>.

Hui-Yuen, Joyce S., Trang T. Duong, et Rae S. M. Yeung. 2006. « TNF-Alpha Is

- Necessary for Induction of Coronary Artery Inflammation and Aneurysm Formation in an Animal Model of Kawasaki Disease ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 176 (10): 6294-6301. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.10.6294>.
- Humphrey, Jay D. 2021. « Mechanisms of Vascular Remodeling in Hypertension ». *American Journal of Hypertension* 34 (5): 432-41. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpaa195>.
- Huynh, John, Nozomi Nishimura, Kuldeepsinh Rana, John M. Peloquin, Joseph P. Califano, Christine R. Montague, Michael R. King, Chris B. Schaffer, et Cynthia A. Reinhart-King. 2011. « Age-Related Intimal Stiffening Enhances Endothelial Permeability and Leukocyte Transmigration ». *Science Translational Medicine* 3 (112): 112ra122. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002761>.
- Ingram, Donald K., Min Zhu, Jacek Mamczarz, Sige Zou, Mark A. Lane, George S. Roth, et Rafael deCabo. 2006. « Calorie Restriction Mimetics: An Emerging Research Field ». *Aging Cell* 5 (2): 97-108. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00202.x>.
- Ito, H., C. Y. Kwan, et E. E. Daniel. 1987. « Elastin and Elastase-like Enzyme Change in Aorta of Rat with Malignant Hypertension ». *Experimental and Molecular Pathology* 47 (1): 26-36. [https://doi.org/10.1016/0014-4800\(87\)90004-9](https://doi.org/10.1016/0014-4800(87)90004-9).
- Izzo, Carmine, Albino Carrizzo, Antonia Alfano, Nicola Virtuoso, Mario Capunzo, Mariaconsiglia Calabrese, Eros De Simone, et al. 2018. « The Impact of Aging on Cardio and Cerebrovascular Diseases ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (2). <https://doi.org/10.3390/ijms19020481>.
- J, Huang, Davis Ec, Chapman Sl, Budatha M, Marmorstein Ly, Word Ra, et Yanagisawa H. 2010. « Fibulin-4 Deficiency Results in Ascending Aortic Aneurysms: A Potential Link between Abnormal Smooth Muscle Cell Phenotype and Aneurysm Progression ». *Circulation Research* 106 (3). <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.207852>.
- Jablonski, Kristen L., Anthony J. Donato, Bradley S. Fleenor, Molly J. Nowlan, Ashley E. Walker, Rachelle E. Kaplon, Dov B. Ballak, et Douglas R. Seals. 2015. « Reduced Large Elastic Artery Stiffness with Regular Aerobic Exercise in Middle-Aged and Older Adults: Potential Role of Suppressed Nuclear Factor  $\kappa$  B Signalling ». *Journal of Hypertension* 33 (12): 2477-82. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000000742>.
- Jacob, M. P., T. Fülöp, G. Foris, et L. Robert. 1987. « Effect of Elastin Peptides on Ion Fluxes in Mononuclear Cells, Fibroblasts, and Smooth Muscle Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (4): 995-99.
- Jacob, Marie-Paule. 2006. « Matrice extracellulaire et vieillissement vasculaire ». *M/S. Médecine sciences [ISSN papier : 0767-0974 ; ISSN numérique : 1958-5381], 2006, Vol. 22, N° 3; p. 273-278*. <https://doi.org/10.1051/medsci/2006223273>.
- Jaisson, Stéphane, Mohsen Kerkeni, Izabella C. R. Santos-Weiss, Faouzi Addad, Mohammed Hammami, et Philippe Gillery. 2015. « Increased Serum Homocitrulline Concentrations Are Associated with the Severity of Coronary Artery Disease ». *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 53 (1): 103-10. <https://doi.org/10.1515/cclm-2014-0642>.
- Jana, S., et G. S. Shekhawat. 2010. « Anethum Graveolens: An Indian Traditional Medicinal Herb and Spice ». *Pharmacognosy Reviews* 4 (8): 179-84. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70915>.

- Jana, Sayantan, Mei Hu, Mengcheng Shen, et Zamaneh Kassiri. 2019. « Extracellular Matrix, Regional Heterogeneity of the Aorta, and Aortic Aneurysm ». *Experimental & Molecular Medicine* 51 (12): 1-15. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0286-3>.
- Jana, Sonali, et Gyan S. Shekhawat. 2010. « Phytochemical Analysis and Antibacterial Screening of in vivo and in vitro Extracts of Indian Medicinal Herb: Anethum graveolens ». *Research Journal of Medicinal Plant* 4 (avril): 206-12. <https://doi.org/10.3923/rjmp.2010.206.212>.
- Jani, B., et C. Rajkumar. 2006. « Ageing and Vascular Ageing ». *Postgraduate Medical Journal* 82 (968): 357-62. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2005.036053>.
- Janicki, Joseph S., et Gregory L. Brower. 2002. « The Role of Myocardial Fibrillar Collagen in Ventricular Remodeling and Function ». *Journal of Cardiac Failure* 8 (6 Suppl): S319-325. <https://doi.org/10.1054/jcaf.2002.129260>.
- Jansen, A. J. Gerard, Emma C. Josefsson, Viktoria Rumjantseva, Qiyong Peter Liu, Hervé Falet, Wolfgang Bergmeier, Stephen M. Cifuni, et al. 2012. « Desialylation Accelerates Platelet Clearance after Refrigeration and Initiates GPIIb/IIIa Metalloproteinase-Mediated Cleavage in Mice ». *Blood* 119 (5): 1263-73. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-05-355628>.
- Jayanth, Preethi, Schammim Ray Amith, Katrina Gee, et Myron R. Szewczuk. 2010. « Neu1 Sialidase and Matrix Metalloproteinase-9 Cross-Talk Is Essential for Neurotrophin Activation of Trk Receptors and Cellular Signaling ». *Cellular Signalling* 22 (8): 1193-1205. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.03.011>.
- Jensen, S. A., B. Vrhovski, et A. S. Weiss. 2000. « Domain 26 of Tropoelastin Plays a Dominant Role in Association by Coacervation ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (37): 28449-54. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004265200>.
- Jimenez, Felipe, Thomas F. Mitts, Kela Liu, Yanting Wang, et Aleksander Hinek. 2006. « Ellagic and Tannic Acids Protect Newly Synthesized Elastic Fibers from Premature Enzymatic Degradation in Dermal Fibroblast Cultures ». *The Journal of Investigative Dermatology* 126 (6): 1272-80. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700285>.
- Johnston, K. W., R. B. Rutherford, M. D. Tilson, D. M. Shah, L. Hollier, et J. C. Stanley. 1991. « Suggested Standards for Reporting on Arterial Aneurysms. Subcommittee on Reporting Standards for Arterial Aneurysms, Ad Hoc Committee on Reporting Standards, Society for Vascular Surgery and North American Chapter, International Society for Cardiovascular Surgery ». *Journal of Vascular Surgery* 13 (3): 452-58. <https://doi.org/10.1067/mva.1991.26737>.
- Jud, Philipp, et Harald Sourij. 2019. « Therapeutic Options to Reduce Advanced Glycation End Products in Patients with Diabetes Mellitus: A Review ». *Diabetes Research and Clinical Practice* 148 (février): 54-63. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.11.016>.
- Karamanos, Nikos K., Achilleas D. Theocharis, Thomas Neill, et Renato V. Iozzo. 2019. « Matrix Modeling and Remodeling: A Biological Interplay Regulating Tissue Homeostasis and Diseases ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 75-76 (janvier): 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.08.007>.
- Karamanos, Nikos K., Achilleas D. Theocharis, Zoi Piperigkou, Dimitra Manou, Alberto Passi, Spyros S. Skandalis, Demitrios H. Vynios, et al. 2021. « A Guide to the

Composition and Functions of the Extracellular Matrix ». *The FEBS Journal* 288 (24): 6850-6912. <https://doi.org/10.1111/febs.15776>.

Karamanou, Konstantina, Marco Franchi, Maurizio Onisto, Alberto Passi, Demitrios H. Vynios, et Stéphane Brézillon. 2020. « Evaluation of Lumican Effects on Morphology of Invading Breast Cancer Cells, Expression of Integrins and Downstream Signaling ». *The FEBS Journal* 287 (22): 4862-80. <https://doi.org/10.1111/febs.15289>.

Karnik, Satyajit K., Benjamin S. Brooke, Antonio Bayes-Genis, Lise Sorensen, Joshua D. Wythe, Robert S. Schwartz, Mark T. Keating, et Dean Y. Li. 2003. « A Critical Role for Elastin Signaling in Vascular Morphogenesis and Disease ». *Development (Cambridge, England)* 130 (2): 411-23.

Karnik, Satyajit K., Joshua D. Wythe, Lise Sorensen, Benjamin S. Brooke, Lisa D. Urness, et Dean Y. Li. 2003. « Elastin Induces Myofibrillogenesis via a Specific Domain, VGVAPG ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 22 (5): 409-25.

Kassai, Behrouz, Philippe Bouyé, Brigitte Gilbert-Dussardier, François Godart, Jean-Benoit Thambo, Massimiliano Rossi, Pierre Cochat, et al. 2019. « Minoxidil versus Placebo in the Treatment of Arterial Wall Hypertrophy in Children with Williams Beuren Syndrome: A Randomized Controlled Trial ». *BMC Pediatrics* 19 (1): 170. <https://doi.org/10.1186/s12887-019-1544-1>.

Kassem, M. M., A. Helkin, K. G. Maier, et V. Gahtan. 2019. « Thrombospondins Differentially Regulate Proteins Involved in Arterial Remodeling ». *Physiological Research* 68 (6): 893-900. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934148>.

Kawecki, Charlotte, Nathalie Hézard, Olivier Bocquet, Gaël Poitevin, Fanja Rabenoelina, Alexandre Kauskot, Laurent Duca, et al. 2014. « Elastin-Derived Peptides Are New Regulators of Thrombosis ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 34 (12): 2570-78. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304432>.

Kechagia, Jenny Z., Johanna Ivaska, et Pere Roca-Cusachs. 2019. « Integrins as Biomechanical Sensors of the Microenvironment ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 20 (8): 457-73. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0134-2>.

Keeley, F. W., et D. J. Johnson. 1986. « The Effect of Developing Hypertension on the Synthesis and Accumulation of Elastin in the Aorta of the Rat ». *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* 64 (1): 38-43. <https://doi.org/10.1139/o86-006>.

Keeley, Fred W., Catherine M. Bellingham, et Kimberley A. Woodhouse. 2002. « Elastin as a Self-Organizing Biomaterial: Use of Recombinantly Expressed Human Elastin Polypeptides as a Model for Investigations of Structure and Self-Assembly of Elastin ». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 357 (1418): 185-89. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.1027>.

Kelleher, Cassandra M., Sean E. McLean, et Robert P. Mecham. 2004. « Vascular Extracellular Matrix and Aortic Development ». *Current Topics in Developmental Biology* 62: 153-88. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(04\)62006-0](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(04)62006-0).

Kent, K. Craig. 2014. « Clinical Practice. Abdominal Aortic Aneurysms ». *The New England Journal of Medicine* 371 (22): 2101-8. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1401430>.

- Khavandgar, Zohreh, Hassem Roman, Jingjing Li, Sara Lee, Hojatollah Vali, Juergen Brinckmann, Elaine C. Davis, et Monzur Murshed. 2014. « Elastin Haploinsufficiency Impedes the Progression of Arterial Calcification in MGP-Deficient Mice ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 29 (2): 327-37. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2039>.
- Kielty, Cay M., Michael J. Sherratt, et C. Adrian Shuttleworth. 2002. « Elastic Fibres ». *Journal of Cell Science* 115 (Pt 14): 2817-28.
- Klonizakis, Markos, Ahmad Alkhatib, Geoff Middleton, et Mark F. Smith. 2013. « Mediterranean Diet- and Exercise-Induced Improvement in Age-Dependent Vascular Activity ». *Clinical Science (London, England: 1979)* 124 (9): 579-87. <https://doi.org/10.1042/CS20120412>.
- Knutsen, Russell H., Scott C. Beeman, Thomas J. Broekelmann, DeLong Liu, Kit Man Tsang, Attila Kovacs, Li Ye, et al. 2018. « Minoxidil Improves Vascular Compliance, Restores Cerebral Blood Flow, and Alters Extracellular Matrix Gene Expression in a Model of Chronic Vascular Stiffness ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 315 (1): H18-32. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00683.2017>.
- Knutsen, Russell H., Leah M. Gober, Elise K. Kronquist, Maninder Kaur, Danielle R. Donahue, Danielle Springer, Zu Xi Yu, et al. 2022. « Elastin Insufficiency Confers Proximal and Distal Pulmonary Vasculopathy in Mice, Partially Remedied by the KATP Channel Opener Minoxidil: Considerations and Cautions for the Treatment of People With Williams-Beuren Syndrome ». *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 9: 886813. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.886813>.
- Komarova, Yulia A., Kevin Kruse, Dolly Mehta, et Asrar B. Malik. 2017. « Protein Interactions at Endothelial Junctions and Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability ». *Circulation Research* 120 (1): 179-206. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.306534>.
- Konova, Emiliana, Stephan Baydanoff, Milena Atanasova, et Angelika Velkova. 2004. « Age-Related Changes in the Glycation of Human Aortic Elastin ». *Experimental Gerontology* 39 (2): 249-54. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2003.10.003>.
- Kowara, Michal, Agnieszka Cudnoch-Jedrzejewska, Grzegorz Opolski, et Pawel Wlodarski. 2017. « MicroRNA Regulation of Extracellular Matrix Components in the Process of Atherosclerotic Plaque Destabilization ». *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 44 (7): 711-18. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12772>.
- Kozel, Beth A., Joshua R. Danback, Jessica L. Waxler, Russell H. Knutsen, Lisa de Las Fuentes, Gyorgy S. Reusz, Eva Kis, Ami B. Bhatt, et Barbara R. Pober. 2014. « Williams Syndrome Predisposes to Vascular Stiffness Modified by Antihypertensive Use and Copy Number Changes in NCF1 ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 63 (1): 74-79. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02087>.
- Kozel, Beth A., Russell H. Knutsen, Li Ye, Christopher H. Ciliberto, Thomas J. Broekelmann, et Robert P. Mecham. 2011. « Genetic Modifiers of Cardiovascular Phenotype Caused by Elastin Haploinsufficiency Act by Extrinsic Noncomplementation ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (52): 44926-36. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.274779>.
- Kozel, Beth A., et Robert P. Mecham. 2019. « Elastic Fiber Ultrastructure and

Assembly ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 84 (novembre): 31-40. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2019.10.002>.

Kozel, Beth A., Brenda J. Rongish, Andras Czirok, Julia Zach, Charles D. Little, Elaine C. Davis, Russell H. Knutsen, Jessica E. Wagenseil, Marilyn A. Levy, et Robert P. Mecham. 2006. « Elastic Fiber Formation: A Dynamic View of Extracellular Matrix Assembly Using Timer Reporters ». *Journal of Cellular Physiology* 207 (1): 87-96. <https://doi.org/10.1002/jcp.20546>.

Krattinger, N., A. Capponi, L. Mazzolai, J.-F. Aubert, D. Caille, P. Nicod, G. Waeber, P. Meda, et J.-A. Haefliger. 2007. « Connexin40 Regulates Renin Production and Blood Pressure ». *Kidney International* 72 (7): 814-22. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002423>.

Kuang, Ping-Ping, John L. Berk, David C. Rishikof, Judith A. Foster, Donald E. Humphries, Dennis A. Ricupero, et Ronald H. Goldstein. 2002. « NF-KappaB Induced by IL-1beta Inhibits Elastin Transcription and Myofibroblast Phenotype ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 283 (1): C58-65. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00314.2001>.

Kusche-Vihrog, Kristina, Boris Schmitz, et Eva Brand. 2015. « Salt Controls Endothelial and Vascular Phenotype ». *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 467 (3): 499-512. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1657-1>.

Kutz, Wendy E., Lauren W. Wang, Hannah L. Bader, Alana K. Majors, Kazushi Iwata, Elias I. Traboulsi, Lynn Y. Sakai, Douglas R. Keene, et Suneel S. Apte. 2011. « ADAMTS10 Protein Interacts with Fibrillin-1 and Promotes Its Deposition in Extracellular Matrix of Cultured Fibroblasts ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (19): 17156-67. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.231571>.

Kuwabara, Jill T., et Michelle D. Tallquist. 2017. « Tracking Adventitial Fibroblast Contribution to Disease ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 37 (9): 1598-1607. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.308199>.

Kwak, Hyo-Bum. 2013. « Aging, Exercise, and Extracellular Matrix in the Heart ». *Journal of Exercise Rehabilitation* 9 (3): 338-47. <https://doi.org/10.12965/jer.130049>.

Labat-Robert, J., M. Bihari-Varga, et L. Robert. 1990. « Extracellular Matrix ». *FEBS Letters* 268 (2): 386-93.

Lafarge, Jean-Charles, Nadia Naour, Karine Clément, et Michèle Guerre-Millo. 2010. « Cathepsins and Cystatin C in Atherosclerosis and Obesity ». *Biochimie* 92 (11): 1580-86. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.04.011>.

Lakatta, Edward G. 2015. « So! What's Aging? Is Cardiovascular Aging a Disease? ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 83 (juin): 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.04.005>.

Lakatta, Edward G., et Daniel Levy. 2003. « Arterial and Cardiac Aging: Major Shareholders in Cardiovascular Disease Enterprises: Part I: Aging Arteries: A "Set up" for Vascular Disease ». *Circulation* 107 (1): 139-46. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000048892.83521.58>.

Langille, B. L. 1993. « Remodeling of Developing and Mature Arteries: Endothelium, Smooth Muscle, and Matrix ». *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 21 Suppl 1: S11-17. <https://doi.org/10.1097/00005344-199321001-00003>.

- Langille, B. L. 1996. « Arterial Remodeling: Relation to Hemodynamics ». *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 74 (7): 834-41.
- Lannoy, Morgane, Séverin Slove, Liliane Louedec, Christine Choqueux, Clément Journé, Jean-Baptiste Michel, et Marie-Paule Jacob. 2014. « Inhibition of ERK1/2 Phosphorylation: A New Strategy to Stimulate Elastogenesis in the Aorta ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 64 (2): 423-30. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03352>.
- LaRocca, Thomas J., Christopher R. Martens, et Douglas R. Seals. 2017. « Nutrition and Other Lifestyle Influences on Arterial Aging ». *Ageing Research Reviews* 39 (octobre): 106-19. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.09.002>.
- Lavie, Lena. 2015. « Oxidative Stress in Obstructive Sleep Apnea and Intermittent Hypoxia--Revisited--the Bad Ugly and Good: Implications to the Heart and Brain ». *Sleep Medicine Reviews* 20 (avril): 27-45. <https://doi.org/10.1016/j.smr.2014.07.003>.
- Le Page, Aurélie, Abdelouahed Khalil, Patrick Vermette, Eric H. Frost, Anis Larbi, Jacek M. Witkowski, et Tamas Fulop. 2019. « The Role of Elastin-Derived Peptides in Human Physiology and Diseases ». *Matrix Biology* 84 (novembre): 81-96. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2019.07.004>.
- Lee, Jaime, Matthew Pase, Andrew Pipingas, Jessica Raubenheimer, Madeline Thurgood, Lorena Villalon, Helen Macpherson, Amy Gibbs, et Andrew Scholey. 2015. « Switching to a 10-Day Mediterranean-Style Diet Improves Mood and Cardiovascular Function in a Controlled Crossover Study ». *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 31 (5): 647-52. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2014.10.008>.
- Lee, Mary Y. K., Grace Ge, M. L. Fung, Paul M. Vanhoutte, Judith C. W. Mak, et Mary S. M. Ip. 2018. « Low but Not High Frequency of Intermittent Hypoxia Suppresses Endothelium-Dependent, Oxidative Stress-Mediated Contractions in Carotid Arteries of Obese Mice ». *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 125 (5): 1384-95. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00224.2018>.
- Lee, Pearl, Daniel V. Bax, Marcela M. M. Bilek, et Anthony S. Weiss. 2014. « A Novel Cell Adhesion Region in Tropoelastin Mediates Attachment to Integrin  $\alpha$ V $\beta$ 5 ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (3): 1467-77. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.518381>.
- Leenen, Frans H. H. 2014. « Actions of Circulating Angiotensin II and Aldosterone in the Brain Contributing to Hypertension ». *American Journal of Hypertension* 27 (8): 1024-32. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpu066>.
- Lefebvre, Blandine, Diane Godin-Ribuot, Marie Joyeux-Faure, Françoise Caron, Germain Bessard, Patrick Lévy, et Françoise Stanke-Labesque. 2006. « Functional Assessment of Vascular Reactivity after Chronic Intermittent Hypoxia in the Rat ». *Respiratory Physiology & Neurobiology* 150 (2-3): 278-86. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2005.05.020>.
- Levine, H. J. 1997. « Rest Heart Rate and Life Expectancy ». *Journal of the American College of Cardiology* 30 (4): 1104-6. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(97\)00246-5](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(97)00246-5).
- Lévy, Patrick, Malcolm Kohler, Walter T. McNicholas, Ferran Barbé, R. Doug McEvoy, Virend K. Somers, Lena Lavie, et Jean-Louis Pépin. 2015a. « Obstructive Sleep Apnoea Syndrome ». *Nature Reviews. Disease Primers* 1: 15015.

<https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.15>.

Li, Bin, Darwin O. V. Alonso, Brian J. Bennion, et Valerie Daggett. 2001. « Hydrophobic Hydration Is an Important Source of Elasticity in Elastin-Based Biopolymers ». *Journal of the American Chemical Society* 123 (48): 11991-98. <https://doi.org/10.1021/ja010363e>.

Li, D. Y., B. Brooke, E. C. Davis, R. P. Mecham, L. K. Sorensen, B. B. Boak, E. Eichwald, et M. T. Keating. 1998. « Elastin Is an Essential Determinant of Arterial Morphogenesis ». *Nature* 393 (6682): 276-80. <https://doi.org/10.1038/30522>.

Li, D. Y., G. Faury, D. G. Taylor, E. C. Davis, W. A. Boyle, R. P. Mecham, P. Stenzel, B. Boak, et M. T. Keating. 1998. « Novel Arterial Pathology in Mice and Humans Hemizygous for Elastin ». *The Journal of Clinical Investigation* 102 (10): 1783-87. <https://doi.org/10.1172/JCI4487>.

Li, Wei, Qingle Li, Lingfeng Qin, Rahmat Ali, Yibing Qyang, May Tassabehji, Barbara R. Pober, William C. Sessa, Frank J. Giordano, et George Tellides. 2013. « Rapamycin Inhibits Smooth Muscle Cell Proliferation and Obstructive Arteriopathy Attributable to Elastin Deficiency ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 33 (5): 1028-35. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300407>.

Liao, Y., K. H. Day, D. N. Damon, et B. R. Duling. 2001. « Endothelial Cell-Specific Knockout of Connexin 43 Causes Hypotension and Bradycardia in Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (17): 9989-94. <https://doi.org/10.1073/pnas.171305298>.

Lillehoj, Erik P., Sang Won Hyun, Chiguang Feng, Lei Zhang, Anguo Liu, Wei Guang, Chinh Nguyen, et al. 2012. « NEU1 Sialidase Expressed in Human Airway Epithelia Regulates Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and MUC1 Protein Signaling ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (11): 8214-31. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.292888>.

Lillie, M. A., G. W. Chalmers, et J. M. Gosline. 1994. « The Effects of Heating on the Mechanical Properties of Arterial Elastin ». *Connective Tissue Research* 31 (1): 23-35.

Lin, Chien-Jung, Marius C. Staiculescu, Jie Z. Hawes, Austin J. Cocciolone, Bridget M. Hunkins, Robyn A. Roth, Chieh-Yu Lin, Robert P. Mecham, et Jessica E. Wagenseil. 2019. « Heterogeneous Cellular Contributions to Elastic Laminae Formation in Arterial Wall Development ». *Circulation Research* 125 (11): 1006-18. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.315348>.

Lindsay, Mark E., et Harry C. Dietz. 2011. « Lessons on the Pathogenesis of Aneurysm from Heritable Conditions ». *Nature* 473 (7347): 308-16. <https://doi.org/10.1038/nature10145>.

Liu, Jianghuai, Celeste B. Rich, Jo Ann Buczek-Thomas, Matthew A. Nugent, Mikhail P. Panchenko, et Judith Ann Foster. 2003. « Heparin-Binding EGF-like Growth Factor Regulates Elastin and FGF-2 Expression in Pulmonary Fibroblasts ». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 285 (5): L1106-1115. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00180.2003>.

Liu, Kiao Ling, Laurence Canaple, Peggy Del Carmine, Karine Gauthier, Michel Beylot, et Ming Lo. 2016. « Thyroid Hormone Receptor- $\alpha$  Deletion Decreases Heart Function and Exercise Performance in Apolipoprotein E-Deficient Mice ». *Physiological*

*Genomics* 48 (2): 73-81. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00115.2015>.

Liu, Shu-Lin, Anamika Bajpai, Elizabeth A. Hawthorne, Yongho Bae, Paola Castagnino, James Monslow, Ellen Puré, Kara L. Spiller, et Richard K. Assoian. 2019. « Cardiovascular Protection in Females Linked to Estrogen-Dependent Inhibition of Arterial Stiffening and Macrophage MMP12 ». *JCI Insight* 4 (1): 122742. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.122742>.

Liu, Xiaoqing, Yun Zhao, Jiangang Gao, Basil Pawlyk, Barry Starcher, Jeffrey A. Spencer, Hiromi Yanagisawa, Jian Zuo, et Tiansen Li. 2004. « Elastic Fiber Homeostasis Requires Lysyl Oxidase-like 1 Protein ». *Nature Genetics* 36 (2): 178-82. <https://doi.org/10.1038/ng1297>.

Liu, Yuming, Adib Keikhosravi, Guneet S. Mehta, Cole R. Drifka, et Kevin W. Eliceiri. 2017. « Methods for Quantifying Fibrillar Collagen Alignment ». *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1627: 429-51. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7113-8\\_28](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7113-8_28).

Liu, Yuming, Adib Keikhosravi, Carolyn A. Pehlke, Jeremy S. Bredfeldt, Matthew Dutson, Haixiang Liu, Guneet S. Mehta, et al. 2020. « Fibrillar Collagen Quantification With Curvelet Transform Based Computational Methods ». *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8: 198. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00198>.

Loeys, Bart, Lionel Van Maldergem, Geert Mortier, Paul Coucke, Sabine Gerniers, Jean-Marie Naeyaert, et Anne De Paepe. 2002. « Homozygosity for a Missense Mutation in Fibulin-5 (FBLN5) Results in a Severe Form of Cutis Laxa ». *Human Molecular Genetics* 11 (18): 2113-18. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.18.2113>.

Lomashvili, Koba A., Scott Cobbs, Randolph A. Hennigar, Kenneth I. Hardcastle, et W. Charles O'Neill. 2004. « Phosphate-Induced Vascular Calcification: Role of Pyrophosphate and Osteopontin ». *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 15 (6): 1392-1401. <https://doi.org/10.1097/01.asn.0000128955.83129.9c>.

Lu, Yao, Raimund Pechlaner, Jingjing Cai, Hong Yuan, Zhijun Huang, Guoping Yang, Jiangang Wang, Zhiheng Chen, Stefan Kiechl, et Qingbo Xu. 2020. « Trajectories of Age-Related Arterial Stiffness in Chinese Men and Women ». *Journal of the American College of Cardiology* 75 (8): 870-80. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.12.039>.

Luis, O. de, M. C. Valero, et L. A. Jurado. 2000. « WBSCR14, a Putative Transcription Factor Gene Deleted in Williams-Beuren Syndrome: Complete Characterisation of the Human Gene and the Mouse Ortholog ». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 8 (3): 215-22. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200435>.

Maeda, Iori, Noriaki Mizoiri, Maria Portia P. Briones, et Kouji Okamoto. 2007. « Induction of Macrophage Migration through Lactose-Insensitive Receptor by Elastin-Derived Nonapeptides and Their Analog ». *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society* 13 (4): 263-68. <https://doi.org/10.1002/psc.845>.

Magesh, Sadagopan, Vats Savita, Setsuko Moriya, Tohru Suzuki, Taeko Miyagi, Hideharu Ishida, et Makoto Kiso. 2009. « Human Sialidase Inhibitors: Design, Synthesis, and Biological Evaluation of 4-Acetamido-5-Acylamido-2-Fluoro Benzoic Acids ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17 (13): 4595-4603. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.04.065>.

Mäki, Joni M., Juha Räsänen, Hilikka Tikkanen, Raija Sormunen, Kaarin Mäkikallio,

Kari I. Kivirikko, et Raija Soininen. 2002. « Inactivation of the Lysyl Oxidase Gene Lox Leads to Aortic Aneurysms, Cardiovascular Dysfunction, and Perinatal Death in Mice ». *Circulation* 106 (19): 2503-9. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000038109.84500.1e>.

Malvagia, Sabrina, Amelia Morrone, Anna Caciotti, Tiziana Bardelli, Alessandra d'Azzo, Gina Ancora, Enrico Zammarchi, et Maria Alice Donati. 2004. « New Mutations in the PPBG Gene Lead to Loss of PPCA Protein Which Affects the Level of the Beta-Galactosidase/Neuraminidase Complex and the EBP-Receptor ». *Molecular Genetics and Metabolism* 82 (1): 48-55. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2004.02.007>.

Mammoto, Akiko, Kienna Matus, et Tadanori Mammoto. 2022. « Extracellular Matrix in Aging Aorta ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10 (février): 822561. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.822561>.

Mariko, Boubacar, Mylène Pezet, Brigitte Escoubet, Stéphanie Bouillot, Jean-Pierre Andrieu, Barry Starcher, Daniela Quaglino, et al. 2011. « Fibrillin-1 Genetic Deficiency Leads to Pathological Ageing of Arteries in Mice ». *The Journal of Pathology* 224 (1): 33-44. <https://doi.org/10.1002/path.2840>.

Marín, Carmen, Elena M. Yubero-Serrano, José López-Miranda, et Francisco Pérez-Jiménez. 2013. « Endothelial Aging Associated with Oxidative Stress Can Be Modulated by a Healthy Mediterranean Diet ». *International Journal of Molecular Sciences* 14 (5): 8869-89. <https://doi.org/10.3390/ijms14058869>.

Marks, Michael S., Harry F. G. Heijnen, et Graça Raposo. 2013. « Lysosome-Related Organelles: Unusual Compartments Become Mainstream ». *Current Opinion in Cell Biology* 25 (4): 495-505. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.04.008>.

Martínez-González, Miguel A., Alfredo Gea, et Miguel Ruiz-Canela. 2019. « The Mediterranean Diet and Cardiovascular Health ». *Circulation Research* 124 (5): 779-98. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313348>.

Martinez-Lemus, Luis A., Michael A. Hill, et Gerald A. Meininger. 2009. « The Plastic Nature of the Vascular Wall: A Continuum of Remodeling Events Contributing to Control of Arteriolar Diameter and Structure ». *Physiology (Bethesda, Md.)* 24 (février): 45-57. <https://doi.org/10.1152/physiol.00029.2008>.

Martini, Frederic. 2004. *Fundamentals of Anatomy & Physiology*. Benjamin Cummings.

Masson, Elsevier. s. d. « Embryologie du coeur normal ». EM-Consulte. Consulté le 13 octobre 2022. <https://www.em-consulte.com/article/218262/embryologie-du-coeur-normal>.

Matsumoto, Takeo, et Kazuaki Nagayama. 2012. « Tensile Properties of Vascular Smooth Muscle Cells: Bridging Vascular and Cellular Biomechanics ». *Journal of Biomechanics*, Special Issue on Cardiovascular Solid Mechanics, 45 (5): 745-55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2011.11.014>.

Matt, Peter, Jennifer Habashi, Thierry Carrel, Duke E. Cameron, Jennifer E. Van Eyk, et Harry C. Dietz. 2008. « Recent Advances in Understanding Marfan Syndrome: Should We Now Treat Surgical Patients with Losartan? ». *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 135 (2): 389-94. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2007.08.047>.

Mattson, Mark P., David B. Allison, Luigi Fontana, Michelle Harvie, Valter D. Longo, Willy J. Malaisse, Michael Mosley, et al. 2014. « Meal Frequency and Timing in Health

and Disease ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (47): 16647-53. <https://doi.org/10.1073/pnas.1413965111>.

Maurice, Pascal, Sébastien Blaise, Stéphanie Gayral, Laurent Debelle, Muriel Laffargue, William Hornebeck, et Laurent Duca. 2013. « Elastin Fragmentation and Atherosclerosis Progression: The Elastokine Concept ». *Trends in Cardiovascular Medicine* 23 (6): 211-21. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2012.12.004>.

McLaughlin, Precious J., Qiuyun Chen, Masahito Horiguchi, Barry C. Starcher, J. Brett Stanton, Thomas J. Broekelmann, Alan D. Marmorstein, et al. 2006. « Targeted Disruption of Fibulin-4 Abolishes Elastogenesis and Causes Perinatal Lethality in Mice ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (5): 1700-1709. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.5.1700-1709.2006>.

McNulty, M., A. Mahmud, P. Spiers, et J. Feely. 2006. « Collagen Type-I Degradation Is Related to Arterial Stiffness in Hypertensive and Normotensive Subjects ». *Journal of Human Hypertension* 20 (11): 867-73. <https://doi.org/10.1038/sj.jhh.1002015>.

Mecham, R. P., G. L. Griffin, J. G. Madaras, et R. M. Senior. 1984. « Appearance of Chemotactic Responsiveness to Elastin Peptides by Developing Fetal Bovine Ligament Fibroblasts Parallels the Onset of Elastin Production ». *The Journal of Cell Biology* 98 (5): 1813-16. <https://doi.org/10.1083/jcb.98.5.1813>.

Meza, D., W.-H. Li, I. Seo, R. Parsa, S. Kaur, M. Kizoulis, et M. D. Southall. 2020. « A Blackberry-Dill Extract Combination Synergistically Increases Skin Elasticity ». *International Journal of Cosmetic Science* 42 (5): 444-51. <https://doi.org/10.1111/ics.12644>.

Miao, Ming, Sean E. Reichheld, Lisa D. Muiznieks, Yayi Huang, et Fred W. Keeley. 2013. « Elastin Binding Protein and FKBP65 Modulate in Vitro Self-Assembly of Human Tropoelastin ». *Biochemistry* 52 (44): 7731-41. <https://doi.org/10.1021/bi400760f>.

Micale, Lucia, Maria Giuseppina Turturo, Carmela Fusco, Bartolomeo Augello, Luis A. Pérez Jurado, Claudia Izzi, Maria Cristina Digilio, et al. 2010. « Identification and Characterization of Seven Novel Mutations of Elastin Gene in a Cohort of Patients Affected by Supravalvular Aortic Stenosis ». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 18 (3): 317-23. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2009.181>.

Miekus, Natalia, Chiara Luise, Wolfgang Sippl, Tomasz Baczek, Christian E. H. Schmelzer, et Andrea Heinz. 2019. « MMP-14 Degrades Tropoelastin and Elastin ». *Biochimie* 165 (octobre): 32-39. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.07.001>.

Mikael, Luana de Rezende, Anelise Machado Gomes de Paiva, Marco Mota Gomes, Ana Luiza Lima Sousa, Paulo César Brandão Veiga Jardim, Priscila Valverde de Oliveira Vitorino, Maicon Borges Euzébio, Wátila de Moura Sousa, et Weimar Kunz Sebba Barroso. 2017. « Vascular Aging and Arterial Stiffness ». *Arquivos Brasileiros De Cardiologia* 109 (3): 253-58. <https://doi.org/10.5935/abc.20170091>.

Miranti, Cindy K., et Joan S. Brugge. 2002. « Sensing the Environment: A Historical Perspective on Integrin Signal Transduction ». *Nature Cell Biology* 4 (4): E83-90. <https://doi.org/10.1038/ncb0402-e83>.

Mithieux, Suzanne M., et Anthony S. Weiss. 2005. « Elastin ». *Advances in Protein Chemistry* 70: 437-61. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(05\)70013-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(05)70013-9).

- Mochizuki, Satsuki, Bertrand Brassart, et Aleksander Hinek. 2002. « Signaling Pathways Transduced through the Elastin Receptor Facilitate Proliferation of Arterial Smooth Muscle Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (47): 44854-63. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205630200>.
- Möhle, Brigitte, Werner Heller, et Eckard Wellmann. 1985. « UV-Induced Biosynthesis of Quercetin 3-O-β-D-Glucuronide in Dill Cell Cultures ». *Phytochemistry* 24 (3): 465-67. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)80748-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80748-7).
- Mohun, Timothy J, et Wolfgang J Weninger. 2011. « Imaging heart development using high-resolution episcopic microscopy ». *Current Opinion in Genetics & Development* 21 (5-2): 573-78. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2011.07.004>.
- Molnar, J., K. S. K. Fong, Q. P. He, K. Hayashi, Y. Kim, S. F. T. Fong, B. Fogelgren, K. Molnarne Szauter, M. Mink, et K. Csiszar. 2003. « Structural and Functional Diversity of Lysyl Oxidase and the LOX-like Proteins ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1647 (1-2): 220-24. [https://doi.org/10.1016/s1570-9639\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/s1570-9639(03)00053-0).
- Moore, Jaime, et Susan Thibeault. 2012. « Insights into the role of elastin in vocal fold health and disease ». *Journal of Voice* 26 (3): 269-75. <https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2011.05.003>.
- Moravec, C. S., T. Ruhe, J. R. Cifani, M. Milovanovic, et P. A. Khairallah. 1994. « Structural and Functional Consequences of Minoxidil-Induced Cardiac Hypertrophy ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 269 (1): 290-96.
- Morreau, H., N. J. Galjart, R. Willemsen, N. Gillemans, X. Y. Zhou, et A. d'Azzo. 1992. « Human Lysosomal Protective Protein. Glycosylation, Intracellular Transport, and Association with Beta-Galactosidase in the Endoplasmic Reticulum ». *The Journal of Biological Chemistry* 267 (25): 17949-56.
- Mourão, P. A. 1991. « Proteoglycans, Glycosaminoglycans and Sulfated Polysaccharides from Connective Tissues ». *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 86 Suppl 3: 13-22. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761991000700003>.
- Muiznieks, Lisa D., Judith T. Cirulis, Astrid van der Horst, Dieter P. Reinhardt, Gijs J. L. Wuite, Régis Pomès, et Fred W. Keeley. 2014. « Modulated Growth, Stability and Interactions of Liquid-like Coacervate Assemblies of Elastin ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 36 (juin): 39-50. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.03.008>.
- Muiznieks, Lisa D., Simon Sharpe, Régis Pomès, et Fred W. Keeley. 2018. « Role of Liquid-Liquid Phase Separation in Assembly of Elastin and Other Extracellular Matrix Proteins ». *Journal of Molecular Biology* 430 (23): 4741-53. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.06.010>.
- Mularczyk, Ewa J., Mukti Singh, Alan R. F. Godwin, Francesco Galli, Neil Humphreys, Antony D. Adamson, Aleksandr Mironov, et al. 2018. « ADAMTS10-Mediated Tissue Disruption in Weill-Marchesani Syndrome ». *Human Molecular Genetics* 27 (21): 3675-87. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy276>.
- Nakamura, Tomoyuki. 2018. « Roles of Short Fibulins, a Family of Matricellular Proteins, in Lung Matrix Assembly and Disease ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 73 (novembre): 21-33.

<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.02.003>.

Nakamura, Tomoyuki, Pilar Ruiz Lozano, Yasuhiro Ikeda, Yoshitaka Iwanaga, Aleksander Hinek, Susumu Minamisawa, Ching-Feng Cheng, et al. 2002. « Fibulin-5/DANCE Is Essential for Elastogenesis in Vivo ». *Nature* 415 (6868): 171-75. <https://doi.org/10.1038/415171a>.

Negrão, Maria R., Elisa Keating, Ana Faria, Isabel Azevedo, et Maria J. Martins. 2006. « Acute Effect of Tea, Wine, Beer, and Polyphenols on Ecto-Alkaline Phosphatase Activity in Human Vascular Smooth Muscle Cells ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (14): 4982-88. <https://doi.org/10.1021/jf060505u>.

Newby, Andrew C. 2012. « Matrix Metalloproteinase Inhibition Therapy for Vascular Diseases ». *Vascular Pharmacology* 56 (5-6): 232-44. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2012.01.007>.

Nicoloff, G., Ch Petrova, P. Christova, et A. Nikolov. 2007. « Detection of Free Elastin-Derived Peptides among Diabetic Children ». *Atherosclerosis* 192 (2): 342-47. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.08.007>.

Nikolov, Asparuh, Ivan Tsinlikov, George Nicoloff, Ivanka Tsinlikova, Alexander Blazhev, et Antoan Garev. 2014. « Abnormal Levels of Age-Elastin Derived Peptides in Sera of Diabetic Patients with Arterial Hypertension ». *Central-European Journal of Immunology* 39 (3): 345-51. <https://doi.org/10.5114/ceji.2014.45946>.

Nonaka, Risa, Fumiaki Sato, et Hiroshi Wachi. 2014. « Domain 36 of Tropoelastin in Elastic Fiber Formation ». *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 37 (4): 698-702. <https://doi.org/10.1248/bpb.b13-00933>.

Novella, Susana, Ana Paula Dantas, Gloria Segarra, Pascual Medina, et Carlos Hermenegildo. 2012. « Vascular Aging in Women: Is Estrogen the Fountain of Youth? ». *Frontiers in Physiology* 3: 165. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00165>.

Ntayi, Carole, Anne-Laure Labrousse, Romain Debret, Philippe Birembaut, Georges Bellon, Frank Antonicelli, William Hornebeck, et Philippe Bernard. 2004. « Elastin-Derived Peptides Upregulate Matrix Metalloproteinase-2-Mediated Melanoma Cell Invasion through Elastin-Binding Protein ». *The Journal of Investigative Dermatology* 122 (2): 256-65. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202X.2004.22228.x>.

Oberleithner, Hans, Wladimir Peters, Kristina Kusche-Vihrog, Stefanie Korte, Hermann Schillers, Katrin Kliche, et Kilian Oberleithner. 2011. « Salt Overload Damages the Glycocalyx Sodium Barrier of Vascular Endothelium ». *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 462 (4): 519-28. <https://doi.org/10.1007/s00424-011-0999-1>.

O'Connell, Mary K., Sushila Murthy, Samson Phan, Chengpei Xu, Joann Buchanan, Ryan Spilker, Ronald L. Dalman, Christopher K. Zarins, Winfried Denk, et Charles A. Taylor. 2008. « The Three-Dimensional Micro- and Nanostructure of the Aortic Medial Lamellar Unit Measured Using 3D Confocal and Electron Microscopy Imaging ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 27 (3): 171-81. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2007.10.008>.

Ogola, Benard O., Margaret A. Zimmerman, Gabrielle L. Clark, Caleb M. Abshire, Kaylee M. Gentry, Kristin S. Miller, et Sarah H. Lindsey. 2018. « New Insights into Arterial Stiffening: Does Sex Matter? ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 315 (5): H1073-87.

<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00132.2018>.

Ooyama, T., K. Fukuda, H. Oda, H. Nakamura, et Y. Hikita. 1987. « Substratum-Bound Elastin Peptide Inhibits Aortic Smooth Muscle Cell Migration in Vitro ». *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)* 7 (6): 593-98. <https://doi.org/10.1161/01.atv.7.6.593>.

O'Rourke, Michael F., et Junichiro Hashimoto. 2007. « Mechanical Factors in Arterial Aging: A Clinical Perspective ». *Journal of the American College of Cardiology* 50 (1): 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.12.050>.

O'Rourke, Michael F., et Michel E. Safar. 2005. « Relationship between Aortic Stiffening and Microvascular Disease in Brain and Kidney: Cause and Logic of Therapy ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 46 (1): 200-204. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000168052.00426.65>.

O'Rourke, Michael F., Michel E. Safar, et Victor Dzau. 2010. « The Cardiovascular Continuum Extended: Aging Effects on the Aorta and Microvasculature ». *Vascular Medicine*, novembre. <https://doi.org/10.1177/1358863X10382946>.

Owens, Elizabeth A., Li Jie, Beverly A. S. Reyes, Elisabeth J. Van Bockstaele, et Patrick Osei-Owusu. 2017. « Elastin Insufficiency Causes Hypertension, Structural Defects and Abnormal Remodeling of Renal Vascular Signaling ». *Kidney International* 92 (5): 1100-1118. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.04.044>.

Oye, Monique, Melissa Oye, et Aleem Ali. 2021. « Signs of Early Cardiac Tamponade Induced by Minoxidil ». *The American Journal of Emergency Medicine* 40 (février): 226.e1-226.e2. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2020.07.050>.

Packard, René R. S., et Peter Libby. 2008. « Inflammation in Atherosclerosis: From Vascular Biology to Biomarker Discovery and Risk Prediction ». *Clinical Chemistry* 54 (1): 24-38. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.097360>.

Page, Matthew J., Jonathan A. C. Sterne, Julian P. T. Higgins, et Matthias Egger. 2021. « Investigating and Dealing with Publication Bias and Other Reporting Biases in Meta-Analyses of Health Research: A Review ». *Research Synthesis Methods* 12 (2): 248-59. <https://doi.org/10.1002/jrsm.1468>.

Pakshir, Pardis, Nina Noskovicova, Monika Lodyga, Dong Ok Son, Ronen Schuster, Amanda Goodwin, Henna Karvonen, et Boris Hinz. 2020. « The myofibroblast at a glance ». *Journal of Cell Science* 133 (13): jcs227900. <https://doi.org/10.1242/jcs.227900>.

Paneni, Francesco, Sarah Costantino, et Francesco Cosentino. 2015. « Molecular Pathways of Arterial Aging ». *Clinical Science (London, England: 1979)* 128 (2): 69-79. <https://doi.org/10.1042/CS20140302>.

Papke, Christina L., et Hiromi Yanagisawa. 2014. « Fibulin-4 and Fibulin-5 in Elastogenesis and beyond: Insights from Mouse and Human Studies ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 37 (juillet): 142-49. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.02.004>.

Parrish, Phoebe C. R., Delong Liu, Russell H. Knutsen, Charles J. Billington, Robert P. Mecham, Yi-Ping Fu, et Beth A. Kozel. 2020. « Whole Exome Sequencing in Patients with Williams-Beuren Syndrome Followed by Disease Modeling in Mice Points to Four Novel Pathways That May Modify Stenosis Risk ». *Human Molecular Genetics* 29 (12): 2035-50. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa093>.

- Pereira, L., K. Andrikopoulos, J. Tian, S. Y. Lee, D. R. Keene, R. Ono, D. P. Reinhardt, et al. 1997. « Targetting of the Gene Encoding Fibrillin-1 Recapitulates the Vascular Aspect of Marfan Syndrome ». *Nature Genetics* 17 (2): 218-22. <https://doi.org/10.1038/ng1097-218>.
- Pereira, L., M. D'Alessio, F. Ramirez, J. R. Lynch, B. Sykes, T. Pangilinan, et J. Bonadio. 1993. « Genomic Organization of the Sequence Coding for Fibrillin, the Defective Gene Product in Marfan Syndrome ». *Human Molecular Genetics* 2 (10): 1762. <https://doi.org/10.1093/hmg/2.10.1762>.
- Perrotta, Ida, Emilio Russo, Caterina Camastra, Gemma Filice, Giulio Di Mizio, Federica Colosimo, Pietrantonio Ricci, et al. 2011. « New Evidence for a Critical Role of Elastin in Calcification of Native Heart Valves: Immunohistochemical and Ultrastructural Study with Literature Review ». *Histopathology* 59 (3): 504-13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.03977.x>.
- Pezet, M., B. Mariko, M. -P. Jacob, et G. Faury. 2009. « Les fibres élastiques : un régulateur du vieillissement normal ou pathologique des vaisseaux sanguins élastiques ». *Médecine & Longévité* 1 (2): 64-75. <https://doi.org/10.1016/j.mlong.2009.10.002>.
- Pezet, Mylène, Marie-Paule Jacob, Brigitte Escoubet, Dealba Gheduzzi, Emmanuelle Tillet, Pascale Perret, Philippe Huber, et al. 2008a. « Elastin Haploinsufficiency Induces Alternative Aging Processes in the Aorta ». *Rejuvenation Research* 11 (1): 97-112. <https://doi.org/10.1089/rej.2007.0587>.
- Philibert, C., S. Bouillot, P. Huber, et G. Faury. 2012. « Protocadherin-12 Deficiency Leads to Modifications in the Structure and Function of Arteries in Mice ». *Pathologie Biologie*, 50th anniversary - French Society For Connective Tissue Research, 60 (1): 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2011.11.005>.
- Phillips, Shane A., E. B. Olson, Barbara J. Morgan, et Julian H. Lombard. 2004. « Chronic Intermittent Hypoxia Impairs Endothelium-Dependent Dilation in Rat Cerebral and Skeletal Muscle Resistance Arteries ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 286 (1): H388-393. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00683.2003>.
- Phinikaridou, Alkystis, Sara Lacerda, Begoña Lavin, Marcelo E. Andia, Alberto Smith, Prakash Saha, et René M. Botnar. 2018. « Tropoelastin: A Novel Marker for Plaque Progression and Instability ». *Circulation. Cardiovascular Imaging* 11 (8): e007303. <https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.117.007303>.
- Pierce, Gary L. 2017. « Mechanisms and Subclinical Consequences of Aortic Stiffness ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 70 (5): 848-53. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.08933>.
- Plana, Emma, Julia Oto, Pilar Medina, Raquel Herranz, Álvaro Fernández-Pardo, Lucia Requejo, et Manuel Miralles. 2022. « Thrombospondins in Human Aortic Aneurysms ». *IUBMB Life* 74 (10): 982-94. <https://doi.org/10.1002/iub.2610>.
- Pober, Barbara R., Mark Johnson, et Zsolt Urban. 2008. « Mechanisms and Treatment of Cardiovascular Disease in Williams-Beuren Syndrome ». *The Journal of Clinical Investigation* 118 (5): 1606-15. <https://doi.org/10.1172/JCI35309>.
- Pocza, Peter, Helga Süli-Vargha, Zsuzsa Darvas, et Andras Falus. 2008. « Locally

Generated VGVAPG and VAPG Elastin-Derived Peptides Amplify Melanoma Invasion via the Galectin-3 Receptor ». *International Journal of Cancer* 122 (9): 1972-80. <https://doi.org/10.1002/ijc.23296>.

Privitera, S., C. A. Prody, J. W. Callahan, et A. Hinek. 1998. « The 67-KDa Enzymatically Inactive Alternatively Spliced Variant of Beta-Galactosidase Is Identical to the Elastin/Laminin-Binding Protein ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (11): 6319-26. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.11.6319>.

Qa'aty, Nour, Matthew Vincent, Yanting Wang, Andrew Wang, Thomas F. Mitts, et Aleksander Hinek. 2015. « Synthetic Ligands of the Elastin Receptor Induce Elastogenesis in Human Dermal Fibroblasts via Activation of Their IGF-1 Receptors ». *Journal of Dermatological Science* 80 (3): 175-85. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2015.10.001>.

Qian, Rui-Qing, et Robert W. Glanville. 1997. « Alignment of Fibrillin Molecules in Elastic Microfibrils Is Defined by Transglutaminase-Derived Cross-Links ». *Biochemistry* 36 (50): 15841-47. <https://doi.org/10.1021/bi971036f>.

Qin, Yanwen, Xu Cao, Jun Guo, Yaozhong Zhang, Lili Pan, Hongjia Zhang, Huihua Li, Chaoshu Tang, Jie Du, et Guo-Ping Shi. 2012. « Deficiency of Cathepsin S Attenuates Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation in Apolipoprotein E-Deficient Mice ». *Cardiovascular Research* 96 (3): 401-10. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs263>.

Qin, Zhenyu. 2015. « Soluble Elastin Peptides in Cardiovascular Homeostasis: Foe or Ally ». *Peptides* 67 (mai): 64-73. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.03.006>.

Qiu, H. Y., B. Valtier, H. A. Struyker-Boudier, et B. I. Levy. 1995. « Mechanical and Contractile Properties of in Situ Localized Mesenteric Arteries in Normotensive and Spontaneously Hypertensive Rats ». *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 33 (3): 159-70.

Quiñones, Mar, Marta Miguel, et Amaya Aleixandre. 2013. « Beneficial Effects of Polyphenols on Cardiovascular Disease ». *Pharmacological Research* 68 (1): 125-31. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.10.018>.

Rabkin, Simon W. 2017. « The Role Matrix Metalloproteinases in the Production of Aortic Aneurysm ». *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 147: 239-65. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.02.002>.

Ramirez, Francesco, Cristina Caescu, Elisabeth Wondimu, et Josephine Galatioto. 2018. « Marfan Syndrome; A Connective Tissue Disease at the Crossroads of Mechanotransduction, TGF $\beta$  Signaling and Cell Stemness ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 71-72: 82-89. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.07.004>.

Raposo, Graça, et Willem Stoorvogel. 2013. « Extracellular Vesicles: Exosomes, Microvesicles, and Friends ». *The Journal of Cell Biology* 200 (4): 373-83. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>.

Raveaud, Stéphanie, Paulette Mezin, Nicole Lavanchy, Barry Starcher, Robert P. Mecham, Jean Verdeti, et Gilles Fauray. 2009. « Effects of Chronic Treatment with a Low Dose of Nicorandil on the Function of the Rat Aorta during Ageing ». *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 36 (10): 988-94.

<https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2009.05174.x>.

Reichheld, Sean E., Lisa D. Muiznieks, Robert Lu, Simon Sharpe, et Fred W. Keeley. 2019. « Sequence Variants of Human Tropoelastin Affecting Assembly, Structural Characteristics and Functional Properties of Polymeric Elastin in Health and Disease ». *Matrix Biology* 84 (novembre): 68-80. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2019.06.010>.

Reinhardt, Dieter P., Jay E. Gambee, Robert N. Ono, Hans Peter Bächinger, et Lynn Y. Sakai. 2000. « Initial Steps in Assembly of Microfibrils: FORMATION OF DISULFIDE-CROSS-LINKED MULTIMERS CONTAINING FIBRILLIN-1\* ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (3): 2205-10. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.3.2205>.

Reynertson, R. H., R. T. Parmley, L. Rodén, et S. Oparil. 1986. « Proteoglycans and Hypertension. I. A Biochemical and Ultrastructural Study of Aorta Glycosaminoglycans in Spontaneously Hypertensive Rats ». *Collagen and Related Research* 6 (1): 77-101. [https://doi.org/10.1016/s0174-173x\(86\)80033-4](https://doi.org/10.1016/s0174-173x(86)80033-4).

Ricard-Blum, Sylvie, Georges Baffet, et Nathalie Théret. 2018. « Molecular and Tissue Alterations of Collagens in Fibrosis ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 68-69 (août): 122-49. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.02.004>.

Ricard-Blum, Sylvie, et Florence Ruggiero. 2005. « The Collagen Superfamily: From the Extracellular Matrix to the Cell Membrane ». *Pathologie-Biologie* 53 (7): 430-42. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2004.12.024>.

Ricard-Blum, Sylvie, et Sylvain D. Vallet. 2016. « Matricryptins Network with Matricellular Receptors at the Surface of Endothelial and Tumor Cells ». *Frontiers in Pharmacology* 7: 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00011>.

Roach, M. R., et A. C. Burton. 1957. « The Reason for the Shape of the Distensibility Curves of Arteries ». *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 35 (8): 681-90.

Robert, L. 1996. « Aging of the Vascular Wall and Atherogenesis: Role of the Elastin-Laminin Receptor ». *Atherosclerosis* 123 (1-2): 169-79.

Robert, L. 1999. « Interaction between Cells and Elastin, the Elastin-Receptor ». *Connective Tissue Research* 40 (2): 75-82. <https://doi.org/10.3109/03008209909029103>.

Robert, L., et J. Labat-Robert. 2014. « Circulating Elastin Peptides, Role in Vascular Pathology ». *Pathologie Biologie* 62 (6): 337-41. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2014.05.020>.

Robert, L., A. M. Robert, et T. Fülöp. 2008. « Rapid Increase in Human Life Expectancy: Will It Soon Be Limited by the Aging of Elastin? ». *Biogerontology* 9 (2): 119-33. <https://doi.org/10.1007/s10522-007-9122-6>.

Robert, Ladislav. 2002. « Elastin, Past, Present and Future ». *Pathologie Biologie* 50 (8): 503-11. [https://doi.org/10.1016/S0369-8114\(02\)00336-X](https://doi.org/10.1016/S0369-8114(02)00336-X).

Robinet, Arnaud, Abdel Fahem, Jean-Hubert Cauchard, Eric Huet, Loïc Vincent, Sandrine Lorimier, Franck Antonicelli, et al. 2005. « Elastin-Derived Peptides Enhance Angiogenesis by Promoting Endothelial Cell Migration and Tubulogenesis through Upregulation of MT1-MMP ». *Journal of Cell Science* 118 (Pt 2): 343-56.

<https://doi.org/10.1242/jcs.01613>.

Robinet, Arnaud, Hervé Millart, Floriane Oszust, William Hornebeck, et Georges Bellon. 2007. « Binding of Elastin Peptides to S-Gal Protects the Heart against Ischemia/Reperfusion Injury by Triggering the RISK Pathway ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21 (9): 1968-78. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6477com>.

Robinson, P. N., E. Arteaga-Solis, C. Baldock, G. Collod-Bérout, P. Booms, A. De Paepe, H. C. Dietz, et al. 2006. « The Molecular Genetics of Marfan Syndrome and Related Disorders ». *Journal of Medical Genetics* 43 (10): 769-87. <https://doi.org/10.1136/jmg.2005.039669>.

Roccabianca, S., C. Bellini, et J. D. Humphrey. 2014. « Computational Modelling Suggests Good, Bad and Ugly Roles of Glycosaminoglycans in Arterial Wall Mechanics and Mechanobiology ». *Journal of the Royal Society, Interface* 11 (97): 20140397. <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0397>.

Rodgers, U. R., et Anthony S. Weiss. 2004. « Integrin Alpha v Beta 3 Binds a Unique Non-RGD Site near the C-Terminus of Human Tropoelastin ». *Biochimie* 86 (3): 173-78. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.03.002>.

Romier, Béatrice, Corinne Ivaldi, Hervé Sartelet, Andrea Heinz, Christian E. H. Schmelzer, Roselyne Garnotel, Alexandre Guillot, et al. 2018. « Production of Elastin-Derived Peptides Contributes to the Development of Nonalcoholic Steatohepatitis ». *Diabetes* 67 (8): 1604-15. <https://doi.org/10.2337/db17-0490>.

Rosenbloom, J., W. R. Abrams, et R. Mecham. 1993. « Extracellular Matrix 4: The Elastic Fiber ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 7 (13): 1208-18.

Ruckman, J. L., P. A. Luvalle, K. E. Hill, M. G. Giro, et J. M. Davidson. 1994. « Phenotypic Stability and Variation in Cells of the Porcine Aorta: Collagen and Elastin Production ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 14 (2): 135-45. [https://doi.org/10.1016/0945-053x\(94\)90003-5](https://doi.org/10.1016/0945-053x(94)90003-5).

Rusciani, Anthony, Laurent Duca, Hervé Sartelet, Aurore Chatron-Colliet, Hélène Bobichon, Dominique Ploton, Richard Le Naour, Sébastien Blaise, Laurent Martiny, et Laurent Debelle. 2010. « Elastin Peptides Signaling Relies on Neuraminidase-1-Dependent Lactosylceramide Generation ». *PLoS ONE* 5 (11): e14010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014010>.

Ryan, Silke. 2018. « Mechanisms of Cardiovascular Disease in Obstructive Sleep Apnoea ». *Journal of Thoracic Disease* 10 (Suppl 34): S4201-11. <https://doi.org/10.21037/jtd.2018.08.56>.

Ryan, Silke, Eoin P. Cummins, Ramon Farre, Alex Gileles-Hillel, Jonathan C. Jun, Henrik Oster, Jean-Louis Pepin, et al. 2020. « Understanding the Pathophysiological Mechanisms of Cardiometabolic Complications in Obstructive Sleep Apnoea: Towards Personalised Treatment Approaches ». *The European Respiratory Journal* 56 (2): 1902295. <https://doi.org/10.1183/13993003.02295-2019>.

Sadeghi, Masoumeh, Shahrouz Kabiri, Atefeh Amerizadeh, Kiyani Heshmat-Ghahdarjani, Gholamreza Masoumi, Zahra Teimouri-Jervekani, et Afshin Amirpour. 2022. « Anethum Graveolens L. (Dill) Effect on Human Lipid Profile: An Updated

Systematic Review ». *Current Problems in Cardiology* 47 (11): 101072. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2021.101072>.

Safar, Michel E. 2018. « Arterial Stiffness as a Risk Factor for Clinical Hypertension ». *Nature Reviews Cardiology* 15 (2): 97-105. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2017.155>.

Safar, Michel E., et Harry Struijker Boudier. 2005. « Vascular Development, Pulse Pressure, and the Mechanisms of Hypertension ». *Hypertension* 46 (1): 205-9. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000167992.80876.26>.

Safar, Michel E., Bernard I. Levy, et Harry Struijker-Boudier. 2003. « Current Perspectives on Arterial Stiffness and Pulse Pressure in Hypertension and Cardiovascular Diseases ». *Circulation* 107 (22): 2864-69. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000069826.36125.B4>.

Safar, Michel E., Véronique Regnault, et Patrick Lacolley. 2020. « Sex Differences in Arterial Stiffening and Central Pulse Pressure: Mechanistic Insights? ». *Journal of the American College of Cardiology* 75 (8): 881-83. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.12.041>.

Sahu, Sushant P., Qianglin Liu, Alisha Prasad, Syed Mohammad Abid Hasan, Qun Liu, Maria Ximena Bastidas Rodriguez, Orna Mukhopadhyay, et al. 2020. « Characterization of fibrillar collagen isoforms in infarcted mouse hearts using second harmonic generation imaging ». *Biomedical Optics Express* 12 (1): 604-18. <https://doi.org/10.1364/BOE.410347>.

Sato, Fumiaki, Ryo Seino-Sudo, Mami Okada, Hiroyasu Sakai, Tetsuro Yumoto, et Hiroshi Wachi. 2017. « Lysyl Oxidase Enhances the Deposition of Tropoelastin through the Catalysis of Tropoelastin Molecules on the Cell Surface ». *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 40 (10): 1646-53. <https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00027>.

Sauvage, M., N. Hinglais, C. Mandet, C. Badier, F. Deslandes, J. B. Michel, et M. P. Jacob. 1998. « Localization of Elastin mRNA and TGF-Beta1 in Rat Aorta and Caudal Artery as a Function of Age ». *Cell and Tissue Research* 291 (2): 305-14.

Savransky, Vladimir, Jonathan Jun, Jianguo Li, Ashika Nanayakkara, Shannon Fonti, Ann B. Moser, Kimberly E. Steele, et al. 2008. « Dyslipidemia and Atherosclerosis Induced by Chronic Intermittent Hypoxia Are Attenuated by Deficiency of Stearoyl Coenzyme A Desaturase ». *Circulation Research* 103 (10): 1173-80. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.178533>.

Saz-Lara, Alicia, Iván Caverro-Redondo, Celia Álvarez-Bueno, Blanca Notario-Pacheco, Marta Carolina Ruiz-Grao, et Vicente Martínez-Vizcaíno. 2021. « The Acute Effect of Exercise on Arterial Stiffness in Healthy Subjects: A Meta-Analysis ». *Journal of Clinical Medicine* 10 (2): 291. <https://doi.org/10.3390/jcm10020291>.

Scandolera, Amandine, Ludivine Odoul, Stéphanie Salesse, Alexandre Guillot, Sébastien Blaise, Charlotte Kawecky, Pascal Maurice, et al. 2016. « The Elastin Receptor Complex: A Unique Matricellular Receptor with High Anti-Tumoral Potential ». *Frontiers in Pharmacology* 7: 32. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00032>.

Scandolera, Amandine, Fanja Rabenoelina, Carine Chaintreuil, Anthony Ruscioni, Pascal Maurice, Sébastien Blaise, Béatrice Romier-Crouzet, et al. 2015. « Uncoupling of Elastin Complex Receptor during In Vitro Aging Is Related to Modifications in Its

Intrinsic Sialidase Activity and the Subsequent Lactosylceramide Production ». *PLOS ONE* 10 (6): e0129994. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129994>.

Schiavinato, Alvise, Douglas R. Keene, Alexander P. Wohl, Diana Corallo, Alfonso Colombatti, Raimund Wagener, Mats Paulsson, Paolo Bonaldo, et Gerhard Sengle. 2016. « Targeting of EMILIN-1 and EMILIN-2 to Fibrillin Microfibrils Facilitates Their Incorporation into the Extracellular Matrix ». *Journal of Investigative Dermatology* 136 (6): 1150-60. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.02.021>.

Schiffmann, E., D. R. Lavender, E. J. Miller, et B. A. Corcoran. 1969. « Amino Acids at the Nucleating Site in Mineralizing Elastic Tissue ». *Calcified Tissue Research* 3 (2): 125-35. <https://doi.org/10.1007/BF02058655>.

Schmelzer, Christian E. H., et Laurent Duca. 2022. « Elastic Fibers: Formation, Function, and Fate during Aging and Disease ». *The FEBS Journal* 289 (13): 3704-30. <https://doi.org/10.1111/febs.15899>.

Schmelzer, Christian E. H., Tobias Hedtke, et Andrea Heinz. 2020. « Unique Molecular Networks: Formation and Role of Elastin Cross-Links ». *IUBMB Life* 72 (5): 842-54. <https://doi.org/10.1002/iub.2213>.

Schmelzer, Christian E. H., Andrea Heinz, Helen Troilo, Michael P. Lockhart-Cairns, Thomas A. Jowitt, Marion F. Marchand, Laurent Bidault, et al. 2019. « Lysyl Oxidase-like 2 (LOXL2)-Mediated Cross-Linking of Tropoelastin ». *The FASEB Journal* 33 (4): 5468-81. <https://doi.org/10.1096/fj.201801860RR>.

Sell, David R., et Vincent M. Monnier. 2012. « Molecular Basis of Arterial Stiffening: Role of Glycation - a Mini-Review ». *Gerontology* 58 (3): 227-37. <https://doi.org/10.1159/000334668>.

Semeraro, Maria Donatella, Cassandra Smith, Melanie Kaiser, Itamar Levinger, Gustavo Duque, Hans-Juergen Gruber, et Markus Herrmann. 2020. « Physical Activity, a Modulator of Aging through Effects on Telomere Biology ». *Aging* 12 (13): 13803-23. <https://doi.org/10.18632/aging.103504>.

Sengle, Gerhard, et Lynn Y. Sakai. 2015. « The Fibrillin Microfibril Scaffold: A Niche for Growth Factors and Mechanosensation? ». *Matrix Biology* 47 (septembre): 3-12. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.05.002>.

Sengle, Gerhard, Ko Tsutsui, Douglas R. Keene, Sara F. Tufa, Eric J. Carlson, Noe L. Charbonneau, Robert N. Ono, et al. 2012. « Microenvironmental Regulation by Fibrillin-1 ». *PLoS Genetics* 8 (1): e1002425. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002425>.

Senior, R. M., G. L. Griffin, et R. P. Mecham. 1980. « Chemotactic Activity of Elastin-Derived Peptides ». *The Journal of Clinical Investigation* 66 (4): 859-62. <https://doi.org/10.1172/JCI109926>.

Senior, R. M., G. L. Griffin, R. P. Mecham, D. S. Wrenn, K. U. Prasad, et D. W. Urry. 1984. « Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly, a Repeating Peptide in Elastin, Is Chemotactic for Fibroblasts and Monocytes ». *The Journal of Cell Biology* 99 (3): 870-74. <https://doi.org/10.1083/jcb.99.3.870>.

Seyrantepe, Volkan, Aleksander Hinek, Junzheng Peng, Michael Fedjaev, Sheila Ernest, Yoshito Kadota, Maryssa Canuel, et al. 2008. « Enzymatic Activity of Lysosomal Carboxypeptidase (Cathepsin) A Is Required for Proper Elastic Fiber

- Formation and Inactivation of Endothelin-1 ». *Circulation* 117 (15): 1973-81. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.733212>.
- Shadwick, R. E. 1999. « Mechanical Design in Arteries ». *The Journal of Experimental Biology* 202 (Pt 23): 3305-13. <https://doi.org/10.1242/jeb.202.23.3305>.
- Shao, Jian-Su, Jun Cai, et Dwight A. Towler. 2006. « Molecular Mechanisms of Vascular Calcification: Lessons Learned from the Aorta ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26 (7): 1423-30. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000220441.42041.20>.
- Shapiro, S. D., S. K. Endicott, M. A. Province, J. A. Pierce, et E. J. Campbell. 1991. « Marked Longevity of Human Lung Parenchymal Elastic Fibers Deduced from Prevalence of D-Aspartate and Nuclear Weapons-Related Radiocarbon ». *The Journal of Clinical Investigation* 87 (5): 1828-34. <https://doi.org/10.1172/JCI115204>.
- Shaw, Lee, et Oliver Wiedow. 2011. « Therapeutic Potential of Human Elafin ». *Biochemical Society Transactions* 39 (5): 1450-54. <https://doi.org/10.1042/BST0391450>.
- Sherratt, Michael J. 2009. « Tissue elasticity and the ageing elastic fibre ». *Age* 31 (4): 305-25. <https://doi.org/10.1007/s11357-009-9103-6>.
- Shikata, T., T. Uzawa, N. Yoshiwara, T. Akatsuka, et S. Yamazaki. 1974. « Staining Methods of Australia Antigen in Paraffin Section--Detection of Cytoplasmic Inclusion Bodies ». *The Japanese Journal of Experimental Medicine* 44 (1): 25-36.
- Sideek, Mohamed A., Clementine Menz, Mahroo K. Parsi, et Mark A. Gibson. 2014. « LTBP-2 Competes with Tropoelastin for Binding to Fibulin-5 and Heparin, and Is a Negative Modulator of Elastinogenesis ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 34 (février): 114-23. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2013.10.007>.
- Simionescu, M., N. Simionescu, et G. E. Palade. 1975. « Segmental Differentiations of Cell Junctions in the Vascular Endothelium. The Microvasculature ». *The Journal of Cell Biology* 67 (3): 863-85. <https://doi.org/10.1083/jcb.67.3.863>.
- Slove, Séverin, Morgane Lannoy, Jacques Behmoaras, Mylène Pezet, Natacha Sloboda, Patrick Lacolley, Brigitte Escoubet, Julia Buján, et Marie-Paule Jacob. 2013. « Potassium Channel Openers Increase Aortic Elastic Fiber Formation and Reverse the Genetically Determined Elastin Deficit in the BN Rat ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 62 (4): 794-801. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01379>.
- Smith, et Kampine. 1990. *Circulatory Physiology the Essentials*. 3rd ed. Baltimore Williams & Wilkins. <http://library.lincoln.ac.uk/items/7761>.
- Sohm, B., V. Cenizo, V. André, H. Zahouani, C. Paillet-Mattei, et B. Vogelgesang. 2011. « Evaluation of the Efficacy of a Dill Extract in Vitro and in Vivo ». *International Journal of Cosmetic Science* 33 (2): 157-63. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2010.00606.x>.
- Sorrell, J. Michael, et Arnold I. Caplan. 2009. « Chapter 4 Fibroblasts—A Diverse Population at the Center of It All ». In *International Review of Cell and Molecular Biology*, 276:161-214. International Review of Cell and Molecular Biology. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(09\)76004-6](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(09)76004-6).

- Sorrentino, T. A., L. Fourman, J. Ferruzzi, K. S. Miller, J. D. Humphrey, et S. Roccabianca. 2015. « Local versus Global Mechanical Effects of Intramural Swelling in Carotid Arteries ». *Journal of Biomechanical Engineering* 137 (4): 041008. <https://doi.org/10.1115/1.4029303>.
- Spessotto, Paola, Marta Cervi, Maria Teresa Mucignat, Gabriella Mungiguerra, Ida Sartoretto, Roberto Doliana, et Alfonso Colombatti. 2003. « Beta 1 Integrin-Dependent Cell Adhesion to EMILIN-1 Is Mediated by the GC1q Domain ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (8): 6160-67. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208322200>.
- Spoel, A. van der, E. Bonten, et A. d'Azzo. 1998. « Transport of Human Lysosomal Neuraminidase to Mature Lysosomes Requires Protective Protein/Cathepsin A ». *The EMBO Journal* 17 (6): 1588-97. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.6.1588>.
- Sproul, Erin P., et W. Scott Argraves. 2013. « A Cytokine Axis Regulates Elastin Formation and Degradation ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 32 (2): 86-94. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2012.11.004>.
- Staiculescu, Marius Catalin, Jungsil Kim, Robert P. Mecham, et Jessica E. Wagenseil. 2017. « Mechanical Behavior and Matrisome Gene Expression in the Aneurysm-Prone Thoracic Aorta of Newborn Lysyl Oxidase Knockout Mice ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 313 (2): H446-56. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00712.2016>.
- Stamm, C., I. Friehs, S. Y. Ho, A. M. Moran, R. A. Jonas, et P. J. del Nido. 2001. « Congenital Supravalvar Aortic Stenosis: A Simple Lesion? ». *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery* 19 (2): 195-202. [https://doi.org/10.1016/s1010-7940\(00\)00647-3](https://doi.org/10.1016/s1010-7940(00)00647-3).
- Stamm, C., C. Kreutzer, D. Zurakowski, G. Nollert, I. Friehs, J. E. Mayer, R. A. Jonas, et P. J. del Nido. 1999. « Forty-One Years of Surgical Experience with Congenital Supravalvular Aortic Stenosis ». *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 118 (5): 874-85. [https://doi.org/10.1016/s0022-5223\(99\)70057-7](https://doi.org/10.1016/s0022-5223(99)70057-7).
- Stenmark, Kurt R., Michael E. Yeager, Karim C. El Kasmi, Eva Nozik-Grayck, Evgenia V. Gerasimovskaya, Min Li, Suzette R. Riddle, et Maria G. Frid. 2013. « The Adventitia: Essential Regulator of Vascular Wall Structure and Function ». *Annual review of physiology* 75: 23-47. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183802>.
- Sterner-Kock, Anja, Irmgard S. Thorey, Katri Koli, Frank Wempe, Jürgen Otte, Thorsten Bangsow, Katharina Kuhlmeier, et al. 2002. « Disruption of the Gene Encoding the Latent Transforming Growth Factor-Beta Binding Protein 4 (LTBP-4) Causes Abnormal Lung Development, Cardiomyopathy, and Colorectal Cancer ». *Genes & Development* 16 (17): 2264-73. <https://doi.org/10.1101/gad.229102>.
- Sun, Jiusong, Galina K. Sukhova, Jie Zhang, Han Chen, Sara Sjöberg, Peter Libby, Mingcan Xia, Na Xiong, Bruce D. Gelb, et Guo-Ping Shi. 2012. « Cathepsin K Deficiency Reduces Elastase Perfusion-Induced Abdominal Aortic Aneurysms in Mice ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32 (1): 15-23. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.235002>.
- Sun, Jiusong, Galina K. Sukhova, Jie Zhang, Han Chen, Sara Sjöberg, Peter Libby, Meixiang Xiang, et al. 2011. « Cathepsin L Activity Is Essential to Elastase Perfusion-Induced Abdominal Aortic Aneurysms in Mice ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and*

- Vascular Biology* 31 (11): 2500-2508. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.230201>.
- Sun, Zhongjie. 2015. « Aging, Arterial Stiffness, and Hypertension ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 65 (2): 252-56. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03617>.
- Swee, M. H., W. C. Parks, et R. A. Pierce. 1995. « Developmental Regulation of Elastin Production. Expression of Tropoelastin Pre-MRNA Persists after down-Regulation of Steady-State MRNA Levels ». *The Journal of Biological Chemistry* 270 (25): 14899-906. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.25.14899>.
- Tadokoro, Seiji, Sanford J. Shattil, Koji Eto, Vera Tai, Robert C. Liddington, Jose M. de Pereda, Mark H. Ginsberg, et David A. Calderwood. 2003. « Talin Binding to Integrin Beta Tails: A Final Common Step in Integrin Activation ». *Science (New York, N.Y.)* 302 (5642): 103-6. <https://doi.org/10.1126/science.1086652>.
- Taghizadeh, Hadi, et Mohammad Tafazzoli-Shadpour. 2017. « Characterization of mechanical properties of lamellar structure of the aortic wall: Effect of aging ». *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 65 (janvier): 20-28. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.08.011>.
- Tajima, S., A. Hayashi, T. Suzuki, et T. Nishikawa. 1995. « Stimulation of Elastin Expression by Minoxidil in Chick Skin Fibroblasts ». *Archives of Dermatological Research* 287 (5): 494-97.
- Tajima, S., H. Wachi, Y. Uemura, et K. Okamoto. 1997. « Modulation by Elastin Peptide VGVAPG of Cell Proliferation and Elastin Expression in Human Skin Fibroblasts ». *Archives of Dermatological Research* 289 (8): 489-92. <https://doi.org/10.1007/s004030050227>.
- Tamburro, Antonio M., Brigida Bochicchio, et Antonietta Pepe. 2005. « The Dissection of Human Tropoelastin: From the Molecular Structure to the Self-Assembly to the Elasticity Mechanism ». *Pathologie Biologie* 53 (7): 383-89. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2004.12.014>.
- Tamburro, Antonio Mario, Antonietta Pepe, et Brigida Bochicchio. 2006. « Localizing  $\alpha$ -Helices in Human Tropoelastin: Assembly of the Elastin "Puzzle" ». *Biochemistry* 45 (31): 9518-30. <https://doi.org/10.1021/bi060289i>.
- Tamisier, R., J. L. Pépin, et P. Lévy. 2011. « Sleep and Pulmonary Diseases ». *Handbook of Clinical Neurology* 98: 471-87. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52006-7.00031-9>.
- Tamisier, R., J. L. Pépin, J. Rémy, J. P. Baguet, J. A. Taylor, J. W. Weiss, et P. Lévy. 2011. « 14 Nights of Intermittent Hypoxia Elevate Daytime Blood Pressure and Sympathetic Activity in Healthy Humans ». *The European Respiratory Journal* 37 (1): 119-28. <https://doi.org/10.1183/09031936.00204209>.
- Tamisier, Renaud, Can Ozan Tan, Jean-Louis Pepin, Patrick Levy, et J. Andrew Taylor. 2015. « Blood Pressure Increases in OSA Due to Maintained Neurovascular Sympathetic Transduction: Impact of CPAP ». *Sleep* 38 (12): 1973-80. <https://doi.org/10.5665/sleep.5252>.
- Tanaka, N., S. Tajima, A. Ishibashi, K. Uchida, et T. Shigematsu. 2001. « Immunohistochemical Detection of Lipid Peroxidation Products, Protein-Bound

Acrolein and 4-Hydroxynonenal Protein Adducts, in Actinic Elastosis of Photodamaged Skin ». *Archives of Dermatological Research* 293 (7): 363-67. <https://doi.org/10.1007/s004030100239>.

Team, QUT Anatomy and Physiology. 2020. « Chapter 7: THE CARDIOVASCULAR SYSTEM: BLOOD VESSELS AND CIRCULATION ». <https://qut.pressbooks.pub/anatomyandphysiology/chapter/chapter-20-the-cardiovascular-system-blood-vessels-and-circulation/>.

Teixido-Tura, Gisela, Alberto Forteza, Jose Rodríguez-Palomares, Jesús González Mirelis, Laura Gutiérrez, Violeta Sánchez, Borja Ibáñez, David García-Dorado, et Artur Evangelista. 2018. « Losartan Versus Atenolol for Prevention of Aortic Dilatation in Patients With Marfan Syndrome ». *Journal of the American College of Cardiology* 72 (14): 1613-18. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.07.052>.

Tembely, Digné, Aubéri Henry, Laetitia Vanalderwiert, Kevin Toussaint, Amar Bennisroune, Sébastien Blaise, Hervé Sartelet, et al. 2022. « The Elastin Receptor Complex: An Emerging Therapeutic Target Against Age-Related Vascular Diseases ». *Frontiers in Endocrinology* 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2022.815356>.

Testai, Lara, Alma Martelli, Mario Cristofaro, Maria C. Breschi, et Vincenzo Calderone. 2013. « Cardioprotective Effects of Different Flavonoids against Myocardial Ischaemia/Reperfusion Injury in Langendorff-Perfused Rat Hearts ». *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 65 (5): 750-56. <https://doi.org/10.1111/jphp.12032>.

« The Top 10 Causes of Death ». s. d. Consulté le 13 juillet 2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.

Theocharis, Achilleas D., Spyros S. Skandalis, Chrysostomi Gialeli, et Nikos K. Karamanos. 2016. « Extracellular Matrix Structure ». *Advanced Drug Delivery Reviews*, Extracellular Matrix (ECM) and ECM-like materials: Therapeutic Tools and Targets in Cancer Treatment, 97 (février): 4-27. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>.

Thomson, Jennifer, Mukti Singh, Alexander Eckersley, Stuart A. Cain, Michael J. Sherratt, et Clair Baldock. 2019. « Fibrillin microfibrils and elastic fibre proteins: Functional interactions and extracellular regulation of growth factors ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 89 (mai): 109-17. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.07.016>.

Thorin-Trescases, Nathalie, et Eric Thorin. 2016. « Lifelong Cyclic Mechanical Strain Promotes Large Elastic Artery Stiffening: Increased Pulse Pressure and Old Age-Related Organ Failure ». *Canadian Journal of Cardiology* 32 (5): 624-33. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2015.12.022>.

Thring, Tamsyn S. A., Pauline Hili, et Declan P. Naughton. 2009. « Anti-Collagenase, Anti-Elastase and Anti-Oxidant Activities of Extracts from 21 Plants ». *BMC Complementary and Alternative Medicine* 9 (août): 27. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-9-27>.

Tokimitsu, I., et S. Tajima. 1994. « Inhibition of Elastin Synthesis by High Potassium Salt Is Mediated by Ca<sup>2+</sup> Influx in Cultured Smooth Muscle Cells in Vitro: Reciprocal Effects of K<sup>+</sup> on Elastin and Collagen Synthesis ». *Journal of Biochemistry* 115 (3):

Torre, Israel González de, Frederic Wolf, Mercedes Santos, Lisanne Rongen, Matilde Alonso, Stefan Jockenhoevel, José C. Rodríguez-Cabello, et Petra Mela. 2015. « Elastin-like Recombinamer-Covered Stents: Towards a Fully Biocompatible and Non-Thrombogenic Device for Cardiovascular Diseases ». *Acta Biomaterialia* 12 (janvier): 146-55. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.10.029>.

Totoson, Perle, Wassim Fhayli, Gilles Faury, Irina Korichneva, Sandrine Cachot, Marie Baldazza, Christophe Ribuot, Jean-Louis Pépin, Patrick Lévy, et Marie Joyeux-Faure. 2013. « Atorvastatin Protects against Deleterious Cardiovascular Consequences Induced by Chronic Intermittent Hypoxia ». *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* 238 (2): 223-32. <https://doi.org/10.1177/1535370212473696>.

Toupance, Simon, Bertrand Brassart, Fanja Rabenoelina, Christelle Ghoneim, Laurent Vallar, Myriam Polette, Laurent Debelle, et Philippe Birembaut. 2012. « Elastin-Derived Peptides Increase Invasive Capacities of Lung Cancer Cells by Post-Transcriptional Regulation of MMP-2 and UPA ». *Clinical & Experimental Metastasis* 29 (5): 511-22. <https://doi.org/10.1007/s10585-012-9467-3>.

Townsend, Nick, Denis Kazakiewicz, F. Lucy Wright, Adam Timmis, Radu Huculeci, Aleksandra Torbica, Chris P. Gale, Stephan Achenbach, Franz Weidinger, et Panos Vardas. 2022. « Epidemiology of Cardiovascular Disease in Europe ». *Nature Reviews Cardiology* 19 (2): 133-43. <https://doi.org/10.1038/s41569-021-00607-3>.

Tran, Khiem A., Xianming Zhang, Dan Predescu, Xiaojia Huang, Roberto F. Machado, Joachim R. Göthert, Asrar B. Malik, Tibor Valyi-Nagy, et You-Yang Zhao. 2016. « Endothelial  $\beta$ -Catenin Signaling Is Required for Maintaining Adult Blood-Brain Barrier Integrity and Central Nervous System Homeostasis ». *Circulation* 133 (2): 177-86. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.015982>.

Trask, T. M., B. C. Trask, T. M. Ritty, W. R. Abrams, J. Rosenbloom, et R. P. Mecham. 2000. « Interaction of Tropoelastin with the Amino-Terminal Domains of Fibrillin-1 and Fibrillin-2 Suggests a Role for the Fibrillins in Elastic Fiber Assembly ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (32): 24400-406. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003665200>.

Tuleta, Izabela, Carolina Nunes França, Daniela Wenzel, Bernd Fleischmann, Georg Nickenig, Nikos Werner, et Dirk Skowasch. 2014. « Hypoxia-Induced Endothelial Dysfunction in Apolipoprotein E-Deficient Mice; Effects of Infliximab and L-Glutathione ». *Atherosclerosis* 236 (2): 400-410. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.08.021>.

Twite, Mark D., Scott Stenquist, et Richard J. Ing. 2019. « Williams Syndrome ». *Pediatric Anesthesia* 29 (5): 483-90. <https://doi.org/10.1111/pan.13620>.

Uemura, T., K. Shiozaki, K. Yamaguchi, S. Miyazaki, S. Satomi, K. Kato, H. Sakuraba, et T. Miyagi. 2009. « Contribution of Sialidase NEU1 to Suppression of Metastasis of Human Colon Cancer Cells through Desialylation of Integrin Beta4 ». *Oncogene* 28 (9): 1218-29. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.471>.

Umeda, H., F. Nakamura, et K. Suyama. 2001. « Oxodesmosine and Isooxodesmosine, Candidates of Oxidative Metabolic Intermediates of Pyridinium Cross-Links in Elastin ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 385 (1): 209-19. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2145>.

- Umeda, H., M. Takeuchi, et K. Suyama. 2001. « Two New Elastin Cross-Links Having Pyridine Skeleton. Implication of Ammonia in Elastin Cross-Linking in Vivo ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (16): 12579-87. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009744200>.
- Urbán, Z., J. Zhang, E. C. Davis, G. K. Maeda, A. Kumar, H. Stalker, J. W. Belmont, C. D. Boyd, et M. R. Wallace. 2001. « Supravalvular Aortic Stenosis: Genetic and Molecular Dissection of a Complex Mutation in the Elastin Gene ». *Human Genetics* 109 (5): 512-20. <https://doi.org/10.1007/s00439-001-0608-z>.
- Urban, Zsolt, Vishwanathan Huchtagowder, Nura Schürmann, Vesna Todorovic, Lior Zilberberg, Jiwon Choi, Carla Sens, et al. 2009. « Mutations in LTBP4 Cause a Syndrome of Impaired Pulmonary, Gastrointestinal, Genitourinary, Musculoskeletal, and Dermal Development ». *American Journal of Human Genetics* 85 (5): 593-605. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.09.013>.
- Urbán, Zsolt, Sheila Riazzi, Thomas L. Seidl, Jodi Katahira, Leslie B. Smoot, David Chitayat, Charles D. Boyd, et Aleksander Hinek. 2002. « Connection between Elastin Haploinsufficiency and Increased Cell Proliferation in Patients with Supravalvular Aortic Stenosis and Williams-Beuren Syndrome ». *American Journal of Human Genetics* 71 (1): 30-44. <https://doi.org/10.1086/341035>.
- Vallet, Sylvain D., et Sylvie Ricard-Blum. 2019. « Lysyl oxidases: from enzyme activity to extracellular matrix cross-links ». *Essays in Biochemistry* 63 (3): 349-64. <https://doi.org/10.1042/EBC20180050>.
- Van der Donckt, Carole, Jozef L. Van Herck, Dorien M. Schrijvers, Greetje Vanhoutte, Marleen Verhoye, Ines Blockx, Annemie Van Der Linden, et al. 2015. « Elastin Fragmentation in Atherosclerotic Mice Leads to Intraplaque Neovascularization, Plaque Rupture, Myocardial Infarction, Stroke, and Sudden Death ». *European Heart Journal* 36 (17): 1049-58. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu041>.
- Van Herck, Jozef L., Guido R. Y. De Meyer, Wim Martinet, Cor E. Van Hove, Kenn Foubert, Mart H. Theunis, Sandra Apers, Hidde Bult, Christiaan J. Vrints, et Arnold G. Herman. 2009. « Impaired Fibrillin-1 Function Promotes Features of Plaque Instability in Apolipoprotein E-Deficient Mice ». *Circulation* 120 (24): 2478-87. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.872663>.
- Varga, Z., M. P. Jacob, J. Csongor, L. Robert, A. Leövey, et T. Fülöp. 1990. « Altered Phosphatidylinositol Breakdown after K-Elastin Stimulation in PMNLs of Elderly ». *Mechanisms of Ageing and Development* 52 (1): 61-70. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(90\)90144-5](https://doi.org/10.1016/0047-6374(90)90144-5).
- Varga, Z., M. P. Jacob, L. Robert, J. Csongor, et T. Fulop. 1997. « Age-Dependent Changes of K-Elastin Stimulated Effector Functions of Human Phagocytic Cells: Relevance for Atherogenesis ». *Experimental Gerontology* 32 (6): 653-62.
- Varga, Z., M. P. Jacob, L. Robert, et T. Fülöp. 1989. « Identification and Signal Transduction Mechanism of Elastin Peptide Receptor in Human Leukocytes ». *FEBS Letters* 258 (1): 5-8. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)81602-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)81602-3).
- Varga, Z., E. M. Kovács, G. Paragh, M. P. Jacob, L. Robert, et T. Fülöp. 1988. « Effect of Elastin Peptides and N-Formyl-Methionyl-Leucyl Phenylalanine on Cytosolic Free Calcium in Polymorphonuclear Leukocytes of Healthy Middle-Aged and Elderly

Subjects ». *Clinical Biochemistry* 21 (2): 127-30. [https://doi.org/10.1016/s0009-9120\(88\)80101-2](https://doi.org/10.1016/s0009-9120(88)80101-2).

Vehviläinen, Piia, Marko Hyytiäinen, et Jorma Keski-Oja. 2009. « Matrix Association of Latent TGF-Beta Binding Protein-2 (LTBP-2) Is Dependent on Fibrillin-1 ». *Journal of Cellular Physiology* 221 (3): 586-93. <https://doi.org/10.1002/jcp.21888>.

Vila, E., N. M. Vivas, A. Tabernero, J. Giraldo, et S. M. Arribas. 1997. « Alpha 1-Adrenoceptor Vasoconstriction in the Tail Artery during Ageing ». *British Journal of Pharmacology* 121 (5): 1017-23. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701193>.

Villa-Bellosta, Ricardo. 2020. « New Insights into Endogenous Mechanisms of Protection against Arterial Calcification ». *Atherosclerosis* 306 (août): 68-74. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2020.03.007>.

Vindin, Howard, Suzanne M. Mithieux, et Anthony S. Weiss. 2019. « Elastin Architecture ». *Matrix Biology* 84 (novembre): 4-16. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2019.07.005>.

Vrhovski, B., S. Jensen, et A. S. Weiss. 1997. « Coacervation Characteristics of Recombinant Human Tropoelastin ». *European Journal of Biochemistry* 250 (1): 92-98. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00092.x>.

Vrhovski, Bernadette, et Anthony S. Weiss. 1998. « Biochemistry of Tropoelastin ». *European Journal of Biochemistry* 258 (1): 1-18. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2580001.x>.

Wachi, H., Y. Seyama, S. Yamashita, H. Suganami, Y. Uemura, K. Okamoto, H. Yamada, et S. Tajima. 1995. « Stimulation of Cell Proliferation and Autoregulation of Elastin Expression by Elastin Peptide VPGVG in Cultured Chick Vascular Smooth Muscle Cells ». *FEBS Letters* 368 (2): 215-19. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00641-l](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00641-l).

Wachi, Hiroshi, Fumiaki Sato, Junji Nakazawa, Risa Nonaka, Zoltan Szabo, Zsolt Urban, Takuo Yasunaga, et al. 2007. « Domains 16 and 17 of Tropoelastin in Elastic Fibre Formation ». *The Biochemical Journal* 402 (1): 63-70. <https://doi.org/10.1042/BJ20061145>.

Wagenseil, Jessica E., et Robert P. Mecham. 2007. « New Insights into Elastic Fiber Assembly ». *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews* 81 (4): 229-40. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20111>.

Wagenseil, Jessica E., et Robert P. Mecham. 2009. « Vascular Extracellular Matrix and Arterial Mechanics ». *Physiological Reviews* 89 (3): 957-89. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2008>.

Wagenseil, Jessica E., et Robert P. Mecham. 2012. « Elastin in large artery stiffness and hypertension ». *Journal of Cardiovascular Translational Research* 5 (3): 264-73. <https://doi.org/10.1007/s12265-012-9349-8>.

Wagner, Charlotte, Cor de Wit, Lisa Kurtz, Christian Grünberger, Armin Kurtz, et Frank Schweda. 2007. « Connexin40 Is Essential for the Pressure Control of Renin Synthesis and Secretion ». *Circulation Research* 100 (4): 556-63. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000258856.19922.45>.

Wahart, Amandine, Thinhinane Hocine, Camille Albrecht, Auberi Henry, Thomas

- Sarazin, Laurent Martiny, Hassan El Btaouri, et al. 2019. « Role of Elastin Peptides and Elastin Receptor Complex in Metabolic and Cardiovascular Diseases ». *The FEBS Journal*, avril. <https://doi.org/10.1111/febs.14836>.
- Wang, Keke, Xiangguang Meng, et Zhikun Guo. 2021. « Elastin Structure, Synthesis, Regulatory Mechanism and Relationship With Cardiovascular Diseases ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (novembre): 596702. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.596702>.
- Wang, Lauren W., Wendy E. Kutz, Timothy J. Mead, Lauren C. Beene, Shweta Singh, Michael W. Jenkins, Dieter P. Reinhardt, et Suneel S. Apte. 2019. « Adamts10 Inactivation in Mice Leads to Persistence of Ocular Microfibrils Subsequent to Reduced Fibrillin-2 Cleavage ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 77 (avril): 117-28. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.09.004>.
- Wang, Mingyi, Liqun Jiang, Robert E. Monticone, et Edward G. Lakatta. 2014. « Proinflammation: The Key to Arterial Aging ». *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 25 (2): 72-79. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.10.002>.
- Wang, Mingyi, Soo Hyuk Kim, Robert E. Monticone, et Edward G. Lakatta. 2015. « Matrix Metalloproteinases Promote Arterial Remodeling in Aging, Hypertension, and Atherosclerosis ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 65 (4): 698-703. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03618>.
- Wang, Yaqiang, Lukas Sušac, et Juli Feigon. 2019. « Structural Biology of Telomerase ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 11 (12): a032383. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032383>.
- Wang, Yun-Ying, Ai-Fang Chen, Hua-Zhang Wang, Li-Yan Xie, Ke-Xu Sui, et Qi-Yi Zhang. 2011. « Association of Shorter Mean Telomere Length with Large Artery Stiffness in Patients with Coronary Heart Disease ». *The Aging Male: The Official Journal of the International Society for the Study of the Aging Male* 14 (1): 27-32. <https://doi.org/10.3109/13685538.2010.529196>.
- Wang, Yuyu, Huajun Xu, Yingjun Qian, Jian Guan, Hongliang Yi, et Shankai Yin. 2017. « Patients with Obstructive Sleep Apnea Display Decreased Flow-Mediated Dilatation: Evidence from a Meta-Analysis ». *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 23 (février): 1069-82. <https://doi.org/10.12659/msm.899716>.
- Wang, Zeneng, Stephen J. Nicholls, E. Rene Rodriguez, Outi Kummu, Sohvi Hökkö, John Barnard, Wanda F. Reynolds, Eric J. Topol, Joseph A. DiDonato, et Stanley L. Hazen. 2007. « Protein Carbamylation Links Inflammation, Smoking, Uremia and Atherogenesis ». *Nature Medicine* 13 (10): 1176-84. <https://doi.org/10.1038/nm1637>.
- Weber, K. T. 1989. « Cardiac Interstitium in Health and Disease: The Fibrillar Collagen Network ». *Journal of the American College of Cardiology* 13 (7): 1637-52. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(89\)90360-4](https://doi.org/10.1016/0735-1097(89)90360-4).
- Weber, K. T., Y. Sun, L. C. Katwa, J. P. Cleutjens, et G. Zhou. 1995. « Connective Tissue and Repair in the Heart. Potential Regulatory Mechanisms ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 752 (mars): 286-99. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1995.tb17438.x>.
- Weiss, N., F. Miller, S. Cazaubon, et P. -O. Couraud. 2009. « Biologie de la barrière

- hématoencéphalique : Partie I ». *Revue Neurologique* 165 (11): 863-74. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2009.03.004>.
- Wessel, A., R. Pankau, D. Kececioglu, W. Ruschewski, et J. H. Bürsch. 1994. « Three Decades of Follow-up of Aortic and Pulmonary Vascular Lesions in the Williams-Beuren Syndrome ». *American Journal of Medical Genetics* 52 (3): 297-301. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320520309>.
- Wessel, Armin, Verena Gravenhorst, Reiner Buchhorn, Angela Gosch, Carl-Joachim Partsch, et Rainer Pankau. 2004. « Risk of Sudden Death in the Williams-Beuren Syndrome ». *American Journal of Medical Genetics. Part A* 127A (3): 234-37. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.30012>.
- Wight, Thomas N. 2008. « Arterial Remodeling in Vascular Disease: A Key Role for Hyaluronan and Versican ». *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 13 (mai): 4933-37. <https://doi.org/10.2741/3052>.
- Wise, Steven G., Suzanne M. Mithieux, Mark J. Raftery, et Anthony S. Weiss. 2005. « Specificity in the Coacervation of Tropoelastin: Solvent Exposed Lysines ». *Journal of Structural Biology* 149 (3): 273-81. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2004.11.006>.
- Wlaschek, M., I. Tantcheva-Poór, L. Naderi, W. Ma, L. A. Schneider, Z. Razi-Wolf, J. Schüller, et K. Scharffetter-Kochanek. 2001. « Solar UV Irradiation and Dermal Photoaging ». *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology* 63 (1-3): 41-51. [https://doi.org/10.1016/s1011-1344\(01\)00201-9](https://doi.org/10.1016/s1011-1344(01)00201-9).
- Wolinsky, H. 1970. « Comparison of Medial Growth of Human Thoracic and Abdominal Aortas ». *Circulation Research* 27 (4): 531-38. <https://doi.org/10.1161/01.res.27.4.531>.
- Wolinsky, H., et S. Glagov. 1964. « STRUCTURAL BASIS FOR THE STATIC MECHANICAL PROPERTIES OF THE AORTIC MEDIA ». *Circulation Research* 14 (mai): 400-413.
- Wolinsky, H., et S. Glagov. 1967. « A Lamellar Unit of Aortic Medial Structure and Function in Mammals ». *Circulation Research* 20 (1): 99-111.
- Wu, Fei-Yi, Abhijit Mondal, Pedro J. Del Nido, Kimberlee Gauvreau, Sitaram M. Emani, Christopher W. Baird, et Aditya K. Kaza. 2019. « Long-Term Surgical Prognosis of Primary Supravalvular Aortic Stenosis Repair ». *The Annals of Thoracic Surgery* 108 (4): 1202-9. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2019.04.094>.
- Yamada, K. M. 1983. « Cell Surface Interactions with Extracellular Materials ». *Annual Review of Biochemistry* 52: 761-99. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.52.070183.003553>.
- Yamamoto, Yuji, Noriyuki Sakata, Jing Meng, Masaya Sakamoto, Akiko Noma, Iori Maeda, Kouji Okamoto, et Shigeo Takebayashi. 2002. « Possible Involvement of Increased Glycooxidation and Lipid Peroxidation of Elastin in Atherogenesis in Haemodialysis Patients ». *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 17 (4): 630-36. <https://doi.org/10.1093/ndt/17.4.630>.
- Yamashiro, Yoshito, et Hiromi Yanagisawa. 2020. « The Molecular Mechanism of Mechanotransduction in Vascular Homeostasis and Disease ». *Clinical Science (London, England: 1979)* 134 (17): 2399-2418. <https://doi.org/10.1042/CS20190488>.

- Yanagisawa, Hiromi, Elaine C. Davis, Barry C. Starcher, Takashi Ouchi, Masashi Yanagisawa, James A. Richardson, et Eric N. Olson. 2002. « Fibulin-5 Is an Elastin-Binding Protein Essential for Elastic Fibre Development in Vivo ». *Nature* 415 (6868): 168-71. <https://doi.org/10.1038/415168a>.
- Yanagisawa, Hiromi, et Jessica Wagenseil. 2019. « Elastic Fibers and Biomechanics of the Aorta: Insights from Mouse Studies ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, mars. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2019.03.001>.
- Yang, Ronghua, Gautam Sikka, Jill Larson, Vabren L. Watts, Xiaolin Niu, Carla L. Ellis, Karen L. Miller, et al. 2011. « Restoring Leptin Signaling Reduces Hyperlipidemia and Improves Vascular Stiffness Induced by Chronic Intermittent Hypoxia ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 300 (4): H1467-1476. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00604.2009>.
- Yurchenco, P. D., et J. J. O'Rear. 1994. « Basal Lamina Assembly ». *Current Opinion in Cell Biology* 6 (5): 674-81. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(94\)90093-0](https://doi.org/10.1016/0955-0674(94)90093-0).
- Zacchigna, Luca, Carmine Vecchione, Antonella Notte, Michelangelo Cordenonsi, Sirio Dupont, Silvia Maretto, Giuseppe Cifelli, et al. 2006. « Emilin1 Links TGF-Beta Maturation to Blood Pressure Homeostasis ». *Cell* 124 (5): 929-42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.12.035>.
- Zampetaki, Anna, Rizwan Attia, Ursula Mayr, Renata S. M. Gomes, Alkystis Phinikaridou, Xiaoke Yin, Sarah R. Langley, et al. 2014. « Role of MiR-195 in Aortic Aneurysmal Disease ». *Circulation Research* 115 (10): 857-66. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.304361>.
- Zanetti, Miriam, Paola Braghetta, Patrizia Sabatelli, Isabella Mura, Roberto Doliana, Alfonso Colombatti, Dino Volpin, Paolo Bonaldo, et Giorgio M. Bressan. 2004. « EMILIN-1 Deficiency Induces Elastogenesis and Vascular Cell Defects ». *Molecular and Cellular Biology* 24 (2): 638-50. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.2.638-650.2004>.
- Zarkovic, Kamelija, Pauline Larroque-Cardoso, Mélanie Pucelle, Robert Salvayre, Georg Waeg, Anne Nègre-Salvayre, et Neven Zarkovic. 2015. « Elastin Aging and Lipid Oxidation Products in Human Aorta ». *Redox Biology* 4: 109-17. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.12.008>.
- Zhang, Yahui, Lin Qi, Lisheng Xu, Xingguo Sun, Wenyan Liu, Shuran Zhou, Frans van de Vosse, et Stephen E. Greenwald. 2018. « Effects of exercise modalities on central hemodynamics, arterial stiffness and cardiac function in cardiovascular disease: Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials ». *PLoS ONE* 13 (7): e0200829. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200829>.
- Zhou, Min, Baolei Guo, Yonggang Wang, Dong Yan, Changpo Lin, et Zhenyu Shi. 2017. « The Association Between Obstructive Sleep Apnea and Carotid Intima-Media Thickness: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Angiology* 68 (7): 575-83. <https://doi.org/10.1177/0003319716665985>.
- Zhou, Shanshan, Yonggang Wang, Yi Tan, Xiaohong Cai, Lu Cai, Jun Cai, et Yang Zheng. 2014. « Deletion of Metallothionein Exacerbates Intermittent Hypoxia-Induced Oxidative and Inflammatory Injury in Aorta ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014: 141053. <https://doi.org/10.1155/2014/141053>.
- Zile, Michael R., Catalin F. Baicu, John S. Ikonomidis, Robert E. Stroud, Paul J. Nietert,

Amy D. Bradshaw, Rebecca Slater, et al. 2015. « Myocardial Stiffness in Patients with Heart Failure and a Preserved Ejection Fraction: Contributions of Collagen and Titin ». *Circulation* 131 (14): 1247-59. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013215>.

Zollinger, Alicia J., et Michael L. Smith. 2017. « Fibronectin, the Extracellular Glue ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 60-61 (juillet): 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.07.011>.

# Annexe



# Rise and fall of elastic fibers from development to aging. Consequences on arterial structure-function and therapeutical perspectives



Wassim Fayli<sup>a,1</sup>, Quentin Boëté<sup>a,1</sup>, Olfa Harki<sup>a,1</sup>, Anne Briançon-Marjollet<sup>a</sup>, Marie-Paule Jacob<sup>b</sup> and Gilles Faury<sup>a</sup>,

*a* - Univ. Grenoble Alpes, Inserm U1042, CHU Grenoble Alpes, HP2, 38000 Grenoble, France

*b* - INSERM, U1148, and Hopital Bichat-Claude Bernard, 46 rue Henri Huchard, 75877 Paris, France

**Correspondence to Gilles Faury:** Laboratoire HP2, INSERM U1042, Université Grenoble Alpes, Bâtiment Jean Roget, Facultés de Médecine et de Pharmacie, Domaine de La Merci, 38706 La Tronche Cedex, France. [Gilles.Faury@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:Gilles.Faury@univ-grenoble-alpes.fr).

<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2019.08.005>

## Abstract

In the arteries of vertebrates, evolution has given rise to resilient macromolecular structures, elastin and elastic fibers, capable of sustaining an elevated blood pressure and smoothening the discontinuous blood flow and pressure generated by the heart. Elastic fibers are produced only during development and childhood, before being progressively degraded by mechanical stress and enzymatic activities during adulthood and aging. During this period, arterial elastic fiber calcification and loading of lipids also occur, all of these events conducting to arteriosclerosis. This leads to a progressive dysfunction of the large elastic arteries inducing elevated blood pressure as well as altered hemodynamics and organ perfusion, which induce more global malfunctions of the body during normal aging. Additionally, some arterial conditions occur more frequently with advancing age, such as atherosclerosis or aneurysms, which are called age-related diseases or pathological aging. The physiological or pathological degradation of elastic fibers and function of elastic arteries seemed to be rather inevitable over time. However, during the recent years, different molecules - including several ATP-dependent potassium channel openers, such as minoxidil - have been shown to re-induce elastin production and elastic fiber assembly, leading to improvements in the arterial structure and function or in organ perfusion. This review summarizes the changes in the arterial elastic fibers and structure from development until aging, and presents some of the potential pharmacotherapies leading to elastic fiber neosynthesis and arterial function improvement.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

## Introduction

The extensible tissues, such as blood vessels, lungs and skin, contain elastic fibers which endow them with elasticity. The arteries are biological tubes, conducting blood from the heart to other organs. They have complex histological structures with varying functions, sizes and anatomical locations, although their walls are composed of three layers, from the lumen to the exterior: the intima, media and adventitia. In the mature artery, the intima is mainly composed of endothelial cells (constituting the interface between the blood and the vascular wall) adhering to a basement membrane, a few fibroblasts, smooth muscle cells and

sparse elastic fibers. The media is mainly made of smooth muscle cells interspersed with various amounts of elastic fibers or, in large arteries, nicely organized concentric elastic lamellae alternating with smooth muscle cell layers with sparse microfibrils and collagen fibers. The first elastic lamella, called the internal elastic lamina, separates the intima from the media, while the more external elastic lamella, called the external elastic lamina, separates the media from the adventitia, all the elastic lamellae accounting for elasticity and resistance to stretch of the wall [1,2]. Collagen fibers and fibroblasts are the major components of the adventitia, which also contains a few microfibrils and elastic fibers [3].

According to their distance from the heart and subsequent decreasing diameters, arteries are divided into large elastic arteries (the aorta and its proximal branches), medium-sized muscular arteries, and smaller distal arterioles [4]. Arteries, especially large arteries, have elastic properties related to their elastic fiber content (and organization) in the media, which decreases with the distance from the heart. The elastic fiber core consists of elastin (90%), which is a polymer of the monomeric precursor tropoelastin and the dominant contributor to the elastic fiber property of elasticity, while the peripheral parts of the elastic fibers are made of fibrillin-rich microfibrils (10%) [5–7]. Elastin and, to a lesser extent, microfibrils provide the elastic fibers and the large elastic arteries with elasticity [8–10], allowing for distention, storage of energy and stroke volume when distended during systole, then discharge of energy and stored blood volume when they return to their initial dimensions during diastole. This phenomenon, known as the Windkessel effect, helps to decrease the load on the heart and smoothens the arterial blood pressure and flow by minimizing the systolic flow and maximizing the diastolic flow in the arterioles [10–13].

Elastin is synthesized from the second half of gestation until the end of childhood, and the maximum elastin quantity in the body is reached before adulthood [12]. During vessel development, elastin and microfibrils are essentially synthesized by vascular smooth muscle cells (VSMC) to form the elastic fibers through complex multistep processes. In the large artery wall, the elastic fibers are then arranged into concentric elastic lamellae alternating with layers of circumferentially-oriented smooth muscle cells, an elastic lamella and its adjacent VSMC layer forming a lamellar unit, or are present in the interlamellar spaces [14].

Elastic fibers are progressively altered by mechanical and enzymatic processes during adulthood and aging. Actually, several age-dependent mechanisms contribute to the arterial stiffening, including medial calcification and lipid deposition [15], as well as elastic fiber disruptions due to the increased activity of elastin-degrading enzymes, such as several matrix metalloproteases (MMP), including MMP-2 and MMP-9 [5,16]. As elastic fibers are gradually damaged, their load-bearing function is presumably taken over by collagen which renders the vessel wall less elastic and more rigid, as observed in the aging process [17]. The loss of elastin and elastic fibers leads to a decrease in the elastin/collagen ratio, resulting in increased arterial stiffness and decreased arterial distensibility [16]. Many studies have also shown that diabetes mellitus and arterial hypertension are important risk factors for functional and structural damages to the arterial wall, resulting in early arterial stiffening [18]. Increased arterial

stiffness causes arterial wall wave reflections at the end of the systole rather than during diastole, which increase systolic and decrease diastolic blood pressures, thus increase pulse pressure [19]. The increase in systolic arterial blood pressure increases the systolic workload of the left ventricle (LV), leading to increased oxygen consumption of the heart, LV hypertrophy and interstitial fibrosis. All of these events related to the increase in arterial stiffness favor cardiovascular morbidity and mortality [20] and predispose to the development of aging-heart failure [21,22]. Arterial stiffness increases with age in both men and women, as measured by carotid to femoral pulse-wave velocity (PWV), a biomarker of arterial stiffness [23,24], although vascular aging does not follow the same chronology in both sexes [25]. Prepubertal females present higher arterial stiffness than boys whereas, during their fertile years, females exhibit equal (central large elastic arteries) or lower (peripheral muscular arteries) arterial stiffness and reduced risk of cardiovascular disease, compared to males [26,27]. This female-related cardiovascular protection might be due to the presence of different isoforms of collagen and sex hormones - mainly estrogens [21]. Estrogens protect the endothelium by increasing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and NO production, and modulating prostacyclin and thromboxane A<sub>2</sub> releases [25]. Later on, during the post-menopausal phase, female aortic distensibility declines sharply and becomes similar to that of males by the age of 60, correlating with hypertension and increased cardiovascular risk in older women [27–30].

This review presents the major determinants of an appropriate structure and function of elastic fibers in large arteries during development and normal aging, as well as two major age-related vascular diseases, *i.e.* atherosclerosis and aneurysms. The perspective of pharmacotherapies aiming at repairing the damaged elastic fibers is also illustrated.

## From development until maturity - role of elastic fibers in the arterial structure and function

In mammals, the systemic blood pressure is regularly increasing with the developmental stage, from -for instance in sheeps, rats or humans - a few mmHg during early gestation to several dozens of mmHg at birth, and around 100 mmHg or above during adulthood [11]. On the contrary, the blood pressure in the pulmonary circulation decreases at birth from, for example in humans and pigs, a foetal blood pressure of 40–60 mmHg, to 20–30 mmHg one day after birth and 10–15 mmHg a few days after birth and until adulthood [11].

In order to sustain these developmental blood pressure changes, which modify the mechanical stresses applied to the blood vessel and stimulating the vascular cells by mechanosensing/mechanotransduction [31], the arteries undergo a progressive remodeling throughout the developmental process, until adulthood. These changes include an increase in diameter and wall thickness of the systemic arteries [32] and, conversely, a decrease in wall thickness at birth regarding the pulmonary arteries [33].

During the development of most mammals, transcription factors such as SOX7 trigger the constitution of the aorta [34], which is first an endothelium-based tube supported by extracellular matrix (ECM), before being surrounded by mesenchymal cells, myoblasts then smooth muscle cells, under the influence of major factors and pathways, including EphB/ephrin-B2 signaling [35]. Around mid-gestation, the elastogenic vascular cells (mainly VSMCs in the media) then produce microfibril-based fibers rich in fibrillins associated to numerous proteins which are important for the structure and function of these fibers. Arterial microfibril assembly requires fibronectin, integrins and heparan sulphate proteoglycans, and starts with the N- and C-terminal processing -by furin- of fibrillins, which then homotypically interact to form microfibrils. Microfibril-associated proteins, most of them presenting different isoforms, then bind to this initial structure, including in particular: latent TGF- $\beta$ -binding proteins (LTBPs, implicated in microfibrillar latent TGF- $\beta$  sequestration), microfibril-associated glycoproteins (MAGPs, participating to elastin deposition onto microfibrils and binding TGF- $\beta$  and fibronectin) and a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type-I motif-like (ADAMTSL, involved at least in fibrillin-1 biogenesis, deposition or assembly) [7]. Some of these constituents are, however, not essential for elastic fiber assembly and function. It is the case for MAGP-1 and -2, although they are more generally regulators of normal vascular development, and their mutation or deficiency is associated with arterial dilation/aneurysm [36]. Microfibril fibers possess elastic properties and are sufficient to smoothen the blood flow and pressure and bear the limited stress applied by a low blood pressure during early gestation [11]. However, they are unable to exert these functions under stresses of higher amplitude, when the blood pressure increases throughout the gestation. Therefore, during the last third of gestation and under the influence of different factors, including TGF- $\beta$  [37], VSMCs synthesize and secrete tropoelastin, the precursor of elastin. Tropoelastin is extracellularly assembled with microfibrils to form mature elastic fibers, which are able to accommodate the forces applied to the arterial wall by higher blood pressures [6,7,12,38]. After exportation, tropoelastin may bind

to integrins, at least of the  $\alpha_v\beta_3$  type, and self-associates to form microaggregates that are then cross-linked (between lysine residues) by lysyl oxydase (LOX). At this stage, fibulin-5 contributes to the limitation of the size of the microaggregates, while fibulin-4 allows for elastin cross-linking by LOX. The microaggregates are later deposited onto microfibrils, where they first align and self-assemble (through a reversible process called coalescence) before being cross-linked by LOX or lysyl oxidase-like-1 (LOXL1), which stabilizes the structure. Fibulin-5 is again involved in this process since it facilitates elastin microaggregate deposition onto microfibrils and, together with fibulin-4, elastin cross-linking. The completion of this step leads to stable and insoluble elastin polymers, which will be the major component of the mature elastic fiber, composed of an elastin core (90%) surrounded by microfibrils (10%) [7].

The major part of the elastic fibers are ultimately structured, in the arterial wall, into thicker concentric elastic lamellae before birth [39,40], resembling in some ways to the elastic lamina present in the pleura of the developing lung [41]. The interplay between VSMCs and elastin/elastic fibers is of major importance in the arterial development since VSMCs produce elastin, which has been shown to be an important regulator of VSMC proliferation as well as intracellular (contractile components) and extracellular (migration) organization [42–44]. After birth, with the continuing augmentation of the blood pressure, elastin and, more slowly, collagen contents increase, together with elastic fiber thickness and the number of elastic lamellae [45]. Collagen I and elastin expressions peak during post-natal growth then return to low levels, while elastin content reaches a plateau before the end of growth [6,12]. Conversely, despite cell proliferation and because of the increase in elastin and collagen contents, the cellularity (= relative cell content) of the large artery wall decreases during the postnatal period [46–48].

The remodeling of the developing elastic artery wall results in a modification of its mechanical properties, which need to be adapted to the increasing blood pressure and pulse pressure and, subsequently, the augmented forces applied to the wall, to permit an appropriate hemodynamics. For instance, the large arteries of the developing sheep are less distensible at low pressure, as compared to vessels from adults [46], whereas the wall thickness and stiffness increase from the prenatal life until adulthood at the corresponding physiological blood pressures or above. On the contrary, by comparison with the situation in the fetus, it has been shown in the pig that the pulmonary arteries become less distensible while their walls are thinning during the period following birth, concomitantly with the post-natal decrease in blood pressure [49].

All the structural components of the arterial wall and their organization account for the mechanical properties of the artery. The endothelial cells do not have a clear direct or structural role in the arterial mechanics. However, they indirectly impact the mechanical properties of the arteries through the secretion of different mediators which modulate the VSMC function. Besides regulating the contraction of VSMCs, therefore vasomotricity, endothelium-derived agents such as NO also stimulate the production of elastin by VSMCs, therefore impacting the arterial mechanics [50,51]. In resting conditions, VSMCs do not seem to account -as structural components- for much of the elastic properties of elastic and muscular arteries, except in the micro-circulation [52–55]. However, they are able to regulate the arterial mechanics, resistance and capacity, through their ability to constrict [52,54] as well as to produce and organize extracellular matrix components, like elastin and collagen [56].

Regarding the extracellular matrix components, the poorly distensible collagen fibers (elastic modulus, indicative of stiffness,  $\sim 1$  GPa) are a major contributor to the arterial wall mechanics. Their resilience and stiffness confer to the arterial walls their resistance to over-extension and therefore protects them against alterations at high strains [12,53]. Vascular microfibrils, mainly made of fibrillins - especially fibrillin-1 - [7], also play a role in the arterial wall mechanics. Their removal from the pig aorta induces stiffness reduction at low strain and increase at high strain [9]. Elastin is present in substantial amounts in the elastic fibers of the elastic lamellae and interlamellar spaces of the large artery walls (>50% of the proximal aorta dry weight), endowing them with elastic properties [12,57]. The elastic fiber can extend up to  $\sim 140\%$ , with an elastic modulus of  $\sim 0.4$  MPa [53,58],  $\sim 1000$  times lower than that of collagen fibers, while the lamellar unit, which is the functional unit of the wall from a mechanical point of view, presents a slightly higher elastic modulus of  $0.5\text{--}0.7$  MPa because of the minor contribution of VSMCs. The elastic fibers have been shown to impart a compressive stress on the collagen, the interplay between these two components explaining the mechanical properties of the composite arterial wall [59]. The mechanical properties of the elastic fibers and lamellar units below or in the physiological blood pressure range explain the ability of the large arteries to smoothen the blood pressure and flow by maintaining a high blood pressure during the diastole [53,60].

The number of concentric elastic lamellae/lamellar units in the arterial wall is also adapted to sustain the mechanical stress imposed by the blood pressure, to maintain the tension per lamella around  $1\text{--}3 \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$  [14]. Therefore, the number of elastic lamellae decreases downstream the vascular tree (from the elastic to the muscular arteries), when the blood

pressure, vessel diameter and subsequent mechanical stress imposed to the arterial wall decrease. For instance, in the rat, 10–13 concentric lamellar units are present in the ascending aorta, 1–3 in the iliac-femoral arteries and 0 in smaller arteries [61]. It has also been shown that lamellar and interlamellar elastic fibers might contribute differentially to the arterial wall mechanical properties [57,62].

During adulthood, the elastic fibers exert their action despite progressive degradation by different enzymes, such as matrix metalloproteinases-2 and -9 (MMP-2 and MMP-9) [5], leading to the release of elastin peptides in the tissues and circulation [63]. These peptides bind to high affinity receptors in many cell types [64] and, in particular, trigger signals leading to intracellular calcium elevation in VSMCs and endothelial cells, and subsequent endothelium- and NO-dependent or endothelium-independent vasodilation [65–68]. Finally, genetic deficiency in the major components of elastic fibers results in discontinuous and irregular elastic fibers, as well as alterations of the arterial wall in mouse models and humans. In the arteries, genetic deficiency in elastin leads to VSMC proliferation, increased number of elastic lamellae and/or stenotic remodeling (Supravalvular aortic stenosis or Williams syndrome) [42,69–72] whereas deficiency in fibrillin-1 leads to aneurysmal pathologies (Marfan syndrome) [73,74].

## Normal arterial aging and elastic fibers

Age-related alterations of elastic fibers lead to impairments of the vessel mechanical properties and have profound effects on the morbidity and mortality in humans [16,75,76].

Elastic fibers are extremely stable over time (elastin half-life of several decades) [77] and particularly resistant to chemical and physical attacks (pH changes, heat, stretching) [78,79]. For these reasons, despite the end of their synthesis after adolescence and their slow alteration throughout adulthood and aging, elastic fibers can endow the arteries with some elasticity until an advanced age [30]. However, the high resistance of elastic fibers is not sufficient to ensure their optimal function throughout life, since the gradual deterioration of these fibers during normal aging progressively alters their elastic properties. Three main alteration mechanisms are involved:

- l) The cyclic mechanical strain imposed over a lifetime by about 3 billion cardiac cycles induces an accumulation of molecular ruptures which progressively modify the elastic fiber structure and lower its elasticity (arterial fatigue) [80],

- II) The binding of several environmental factors (mainly glucose, lipids and calcium) over time modifies the molecular arrangement and interactions, and stiffens the elastic fibers [16]. The progressive calcification of the arterial wall elastin during aging [5] has a potentiating effect on the retention and fixation of cholesterol on the surface of elastic fibers. This contributes to the loss of elasticity of the arterial wall and constitutes an important risk factor involved in atherosclerosis and myocardial infarction [81,82]. Also, non-enzymatic glycation, during which glucose slowly and spontaneously reacts over time with the free  $-NH_2$  groups of the amino-acids, generates Advanced Glycation End products (AGEs) which bridge the residues, therefore altering the protein structure-function. Also, AGE-mediated crosslinking between adjacent proteins leads to the lysis of elastic fibers and their replacement by other matrix components, especially collagen. This phenomenon, particularly affecting the proteins with a long half-life -such as collagen and elastin- which becomes more rigid, participates in the alteration of the cellular responses and leads to arterial stiffening [83–86]. Aging also increases the contents of Milk fat globule-EGF-8 (MFG-E8), a highly glycosylated protein, and its fragment, medin, in the arterial wall. Medin strongly binds to elastic fibers and induces elastolysis and amyloidosis in the arterial wall, affecting vascular elasticity and increasing stiffness and calcification [87].
- III) The dysregulation of the balance between elastic fibers homeostasis and degradation [88]. Actually, elastin and the other components of elastic fibers can be degraded by elastase-type proteases belonging to different classes of proteolytic enzymes (matrix metalloproteinases - MMPs-, as well as serine-, cysteine- and aspartyl-proteases) whose syntheses and activations are modulated by many intrinsic and extrinsic factors [77,88]. In particular, the elastase activity is normally counterbalanced by the constitutive presence of inhibitors in the vascular wall, like the tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), which limit the degradation of elastic fibers [89,90]. However, during aging, the progressive imbalance between proteases and protease inhibitors contributes to increased elastolysis in the arterial wall, inducing a decrease in the elastin/collagen ratio and rigidification [5]. Elastic fibers appear gradually disorganized, thinner and frequently fragmented, which leads to arterial enlargement under the influence of blood pressure as well as parietal thickening because of, at least in part, compensatory collagen production, and decreased elasticity [62,88,91–93].

Furthermore, the degradation of elastin releases elastin peptides, some of them reaching the circulation and being measurable in the serum [63]. Elastin peptides are able to induce multiple biological effects on various cellular targets through their binding to the elastin receptor complex (ERC) [64,94], such as vasodilation when binding to the endothelial ERC [66–68,95]. The number of these receptors does not vary with age [96], but a decoupling of some of their downstream signaling pathways progressively occurs during aging [97]. This phenomenon also contributes to the alteration of the vascular functions, in particular vasomotricity [98] as well as modulation by the extracellular glucose level of calcium homeostasis- and/or NO-related vasodilation and signaling pathways [99]. Nevertheless, during aging, the activation of ERC by elastin peptide continues to trigger the production of elastase and free radicals, enhancing the alteration of the tissues [97,100].

All the above-described age-related changes in the arterial structure, called arteriosclerosis, increase the heart afterload, therefore heart work, and result in left ventricular hypertrophy, possibly fatigue and ultimately failure, in parallel with chronic ischemia of the peripheral tissues, causing a progressive deterioration of the organ functions [80,81,101]. These features of normal cardiovascular aging are rather universal, although a change in the initial availability of the elastic fiber components could modify some main consequences of physiological aging or lead to alternative aging. For instance, mice presenting a heterozygous deletion in the fibrillin-1 gene (Fib-1+/mgΔ) undergo premature aortic aging, including decreased elastin/collagen ratio and increased stiffness [102]. Also, surprisingly, heterozygous mice genetically deficient for elastin (Eln+/-) exhibit some signs of premature aging in adults, such as early increased aortic stiffness, together with the absence -in aged animals- of some other main features of aging, such as aorta wall thickening [103].

Besides normal aging, some deleterious arterial changes appear more frequently with age in some individuals of a given species only, under the influence of environmental factors or genetic predisposition. Two of these age-related diseases will be presented below.

### **Alteration of elastic fiber structure and function during pathological aging of arteries: the examples of atherosclerosis and aneurysms as major age-related diseases**

Aging is considered as an evident risk factor of cardiovascular diseases due to the physiological alteration of the arterial structure. However, some people are more susceptible to the occurrence of

additional arterial or venous diseases in an early “chronological” age [104]. The existence of such a pathological vascular aging suggests that there is a dissociation between biological and chronological age of vessels. In some patients, an “early vascular aging” (EVA) could take place because of genetic defects or exposure, at an early age, to environmental events triggering oxidative stress and inflammation [105,106]. Multiple blood vessel pathologies which present a serious public health problem are related to elastic fiber degradation and have a prevalence/incidence which is clearly increasing with age, such as varicose veins [107], aneurysms [108–110], and atherosclerosis [111], the latter being a major cause of coronary disease and stroke [112]. These two atherosclerosis-related cardiovascular diseases, involving substantial elastic fiber degradation, are the first and third causes of death worldwide, respectively. They nearly cause 250 deaths/100,000 persons/year, which is about 85% of cardiovascular and 28% of total mortality [111]. Aneurysms are caused by elastic fiber degradation and are a major threat to life, *i.e.* the 18th cause of death in the general population (15th cause of death in people older than 65) in the USA, with about 3 fatal ruptured aneurysms per 100,000 persons per year [110]. Because of their important morbidities, increased occurrence and aggravation during aging, severe impact on public health and close relation to arterial elastic fiber degradation, atherosclerosis and aneurysms will be further described in the following sections.

### Atherosclerosis

Atherosclerosis is characterized by the formation, in large and medium-sized arteries, of plaques composed of lipids, calcified regions, immune and foam cells, together with vascular smooth muscle and endothelial cells. Plaque formation starts with circulating LDL-cholesterol diffusion and accumulation in the arterial wall, due to endothelial dysfunction. These lipids are oxidized and subsequently stimulate vascular inflammation and monocyte recruitment in the vascular wall. The monocytes then load the oxidized lipids to form foam cells. Further, accumulation of necrotic debris and ECM components, together with VSMC migration and formation of a fibrous cap, cause the plaque progression. Ultimately, under the influence of the forces applied by the blood flow, plaques can rupture, resulting in thrombus formation and clinical manifestations such as tissue hypoxia and acute ischemic events (*e.g.* myocardial infarction and stroke) [113]. Conversely, intermittent hypoxia, the major consequence of obstructive sleep apnea, induces oxidative stress elevation, sympathetic activation and inflammation, which favor endothelial dysfunction, elastic fiber disorganization, hyperten-

sion and atherosclerosis [114,115]. Structural and physiological changes related to aging of the arterial wall also predispose to or favor atherosclerosis. Some of these major modifications are inflammation, oxidative stress, endothelial dysfunction, formation of collagen bridges, disorganization of elastic fibers and decrease in the elastin/collagen ratio [106,116–118].

The most described event involving the elastic fibers in atherosclerosis is the alteration of the elastin/collagen ratio, due to elastic fiber degradation under the atheroma plaque by elevated elastase-type protease levels [119]. Also, age related-interlamellar collagen accumulation and elastin association with insoluble fibrillar material promote arterial stiffening [92], the intimal rigidification inducing a disruption of endothelial barrier integrity and increasing endothelial permeability. This enhances the transmigration of inflammatory molecules, monocytes and lipids, promoting the development of atherosclerotic lesions [120]. Besides, collagen I, a prominent participant to the aging processes, seems to be involved in endothelial dysfunction, by decreasing NO synthesis [121], as well as in leukocytes recruitment, by increasing SMC expression of vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 [122]. Furthermore, elastin peptides released during age-related elastolysis by overactive elastases could initiate atherogenesis process through several mechanisms. They modulate intracellular calcium level and NO liberation in endothelial cells, promote LDL oxidation, monocyte and leucocyte recruitment through a chemoattractive effect, and modulate the differentiation of lymphocytes present in the plaques [94,123,124]. In parallel, tropoelastin is re-expressed and accumulates in atheroma plaques, and has recently been suggested to be a biomarker for atherosclerotic plaque progression and instability [125]. Finally, in the context of the atherosclerotic plaque, the combined stimulations of VSMCs by disturbed hemodynamic forces applied to the wall, oxidized LDLs and proinflammatory molecules such as IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  induce a phenotypic switch of these cells, from quiescent and contractile to a dedifferentiated proliferative, proinflammatory, migratory and synthetic state. VSMCs then produce different ECM proteins as well as tissue inhibitor of MMP (TIMP) and MMPs, including MMP-2 and MMP-9. The inflammatory cells present in the plaque also produce MMPs and other elastases which, together with the MMPs released by VSMCs, contribute to the remodeling of the extracellular matrix, including elastic fiber degradation [126,127]. The age-related activation of MMP-2 and MMP-9, two key enzymes that enhance the destabilization of atheromatous plaques, is a major aggravating factor for atherosclerosis progression [128,129].

## Aneurysms

An aneurysm is a permanent and localized dilation of an artery presenting at least a 50% increase in diameter compared to the expected normal diameter of the artery [130]. In the large elastic arteries, abdominal aorta aneurysm (AAA) is much more common than thoracic aorta aneurysm (TAA), the prevalence of AAA being 0–5% in females, and between 1 and 12% in males [109]. The associated mortality is high due to aneurysm rupture and subsequent hemorrhage [131], the mortality rate of ruptured AAA being five times higher than that of ruptured TAA [110]. TAAs are often caused by rare gene mutations (see below) with an occurrence early in life (30% of all cases), sporadic with an occurrence increased with aging, or associated with bicuspid aortic valves. The etiology of AAAs, occurring mostly in later life, is related to both environmental factors (smoking habit, older age, male gender, coronary heart disease, hyperlipidemia, hypertension and chronic obstructive pulmonary disease (COPD)) and familial genetic factors different from the rare gene mutations cited for TAAs [132,133].

An aneurysm is not a simple passive dilation, it is rather resulting from an active multifactorial process whose development is triggered by a dynamic wall remodeling. This involves inflammation, oxidative stress, VSMC apoptosis or switch from the differentiated contractile state to an undifferentiated synthetic state. In TAAs, the TGF- $\beta$  stimulation of VSMCs enhances the synthesis of fibrillar ECM, antiproteases, proteases (such as MMP-9) as well as clearance of protease/antiprotease complexes. In AAAs, switched VSMCs also secrete MMPs (such as MMP-2 and -9) whose proteolytic activities are combined with those from MMPs and other elastolytic proteases secreted by immune cells (leukocyte elastase) or exfiltrated from the circulation (plasmin, MMP-8, MMP-9) [132–135]. The changes in VSMC synthesis of ECM and the proteases present in the aneurysmal wall induce major extracellular matrix modifications, which include elevated collagen deposition and an extensive destruction of elastic fibers [136,137]. MMP activation, in particular of MMP-2, MMP-9 and MMP-12, induces substantial elastic fiber degradation in aneurysmal aortic tissues [136] and other organs, such as the emphysematous lung [138]. Aneurysmal regions of the artery present a wall stiffening which results from early ECM disorganization, including elastin and elastic fiber damage, enhanced collagen deposition and disruption of elastin-contractile units. However, the wall elastic modulus (*i.e.* stiffness) in arterial aneurysms decreases with age [139]. These structural modifications of the arterial wall seem to precede the aneurysmal dilation [137,140,141] and are enhanced by aging, which explains the significant influence of age on aneurysm risk [139,142,143], in

addition to genetic predisposition [141]. In particular, genetic deficiencies in some microfibril components have been linked to altered elastic fibers and aneurysmal syndromes, especially TAA in the ascending aorta. For instance, patients with Marfan syndrome -caused by mutations in fibrillin-1 [7,74]- and mice genetically altered for the fibrillin-1 gene develop ascending aorta aneurysms, which even worsen during aging [74,102,144]. Similar aneurysms have also been found in syndromes involving mutations in other microfibril components, such as fibulin-4 or LTBP-4 (*cutis laxa*), or elastic fiber assembly-related molecules such as LOX, while the corresponding murine models feature similar arterial aneurysms [145–148]. Thoracic aneurysmal pathologies has also been linked to abnormalities in TGF- $\beta$  signaling, including mutations in the TGF- $\beta$ 2 (TGFB2), TGF- $\beta$ 3 (TGFB3), TGF- $\beta$  receptor 1 (TGFB1) and TGF- $\beta$  receptor 2 (TGFB2) genes (Loeys-Dietz syndrome) [147]. Because microfibrils are a TGF- $\beta$  reservoir, the occurrence of aneurysms in humans or mice presenting mutations in microfibrillar components, therefore microfibrillar abnormalities, may be due to a dysregulation of TGF- $\beta$  signaling. However, a recent work has shown that mice genetically deficient for fibrillin-1 (Fbn1<sup>C1039G/+</sup>) present thoracic aorta aneurysms that are unrelated to TGF- $\beta$  signaling, which indicates that the onset of thoracic aorta aneurysms might have more complex origins [149].

## Pharmacological reinitiation of elastin or elastic fiber synthesis in aged patients or animals

The challenge of restoring or increasing the elastic fiber content in aged patients or animals (or in pathological conditions) is of particular importance and consists in stimulating the production of the elastic fiber components at a time when the synthesis of several of them is very low.

Tropoelastin, the soluble precursor of elastin, and other elastic fiber components are synthesized in the skin by dermal fibroblasts and in vessels by medial VSMCs. The synthesis of tropoelastin is regulated by numerous chemokines and growth factors [150] and also by potassium (K<sup>+</sup>) and calcium (Ca<sup>2+</sup>) ions. Indeed, K<sup>+</sup> excess in the extracellular medium induces the depolarization of the plasma membrane, which causes the opening of voltage-dependent calcium channels (CaV) and leads to an increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and a decrease in elastin synthesis [151,152]. Such a decrease in elastin synthesis was also shown in VSMCs incubated with the calcium ionophore A23187, which triggers Ca<sup>2+</sup> influx and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> elevation [152,153]. On the contrary, K<sup>+</sup> efflux from cells leads to an increase

in elastin synthesis due to membrane hyperpolarization and CaV closing. This has been shown in experiments using the ATP-dependent K<sup>+</sup> (K<sub>ATP</sub>) channel opener minoxidil, a potent arterial vasodilator which has long been used to treat hypertension. Minoxidil-induced K<sup>+</sup> efflux leads to enhancement of elastin synthesis in cultured VSMCs and skin fibroblasts [151,154]. *In vivo* studies have also demonstrated that the elastin content and/or thickness of elastic lamellae are increased by minoxidil treatment in several animal models: Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) [155], Brown Norway (BN) rats [156], old C57Bl/6 J mice [157] and Eln<sup>+/-</sup> mice [158]. Chronic treatment of mice with minoxidil also results in improvements of the arterial mechanics and cerebral perfusion and, at least in aged animals, in neosynthesis of elastic fibers and protection of pre-existing elastic fibers [157–159]. Other K<sub>ATP</sub> channel openers, like diazoxide or nicorandil, exert an effect on *in vivo* elastin synthesis similar to those induced by minoxidil [156,160], while pinacidil and some cromakalim or diazoxide derivatives have also been shown to induce elastin production by cultured VSMCs in rats [156,161,162]. However, treatment of animals with other antihypertensive drugs, either angiotensin-II type 1 receptor blocker, beta blocker or calcium channel blocker, does not modify the elastin content in mouse arteries [163].

Numerous cytokines which inhibit tropoelastin transcription act through the activation of the Ras/MEK/ERK signaling pathway [150]. The increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in VSMCs also stimulates ERK1/2 phosphorylation. The inhibition of this signaling pathway could thus be a strategy to increase the elastin content in arteries. Actually, by performing *in vitro* and *in vivo* experiments in rats, it has been demonstrated that inhibition of the ERK1/2 phosphorylation leads to increases in elastin synthesis by VSMCs and elastin content in the aorta [153]. The importance of this pathway in elastin metabolism has been confirmed by the demonstration that cortistatin reduces elastin degradation, MMP-2 and -9 expressions and aneurysm progression through the inhibition of the ERK1/2 signaling pathways [164]. Of importance, it has also previously been shown that ERK1/2 signaling is involved in elastin peptide signaling through the elastin receptor complex (ERC) [94].

The general impact of the pharmacological treatments modulating the K<sub>ATP</sub> channels-Ca<sup>2+</sup> channels-ERK1/2 pathways described above is illustrated in Fig. 1.

MEK inhibitors have also been used in order to stimulate elastin synthesis by cells isolated from patients with Costello syndrome, a developmental disorder characterized by hyper-activation of the mitogenic Ras-Raf-MEK/ERK pathway and inhibition of elastogenesis. The treatment of dermal fibroblasts derived from these patients with the MEK inhibitor PD98059 leads to the concomitant

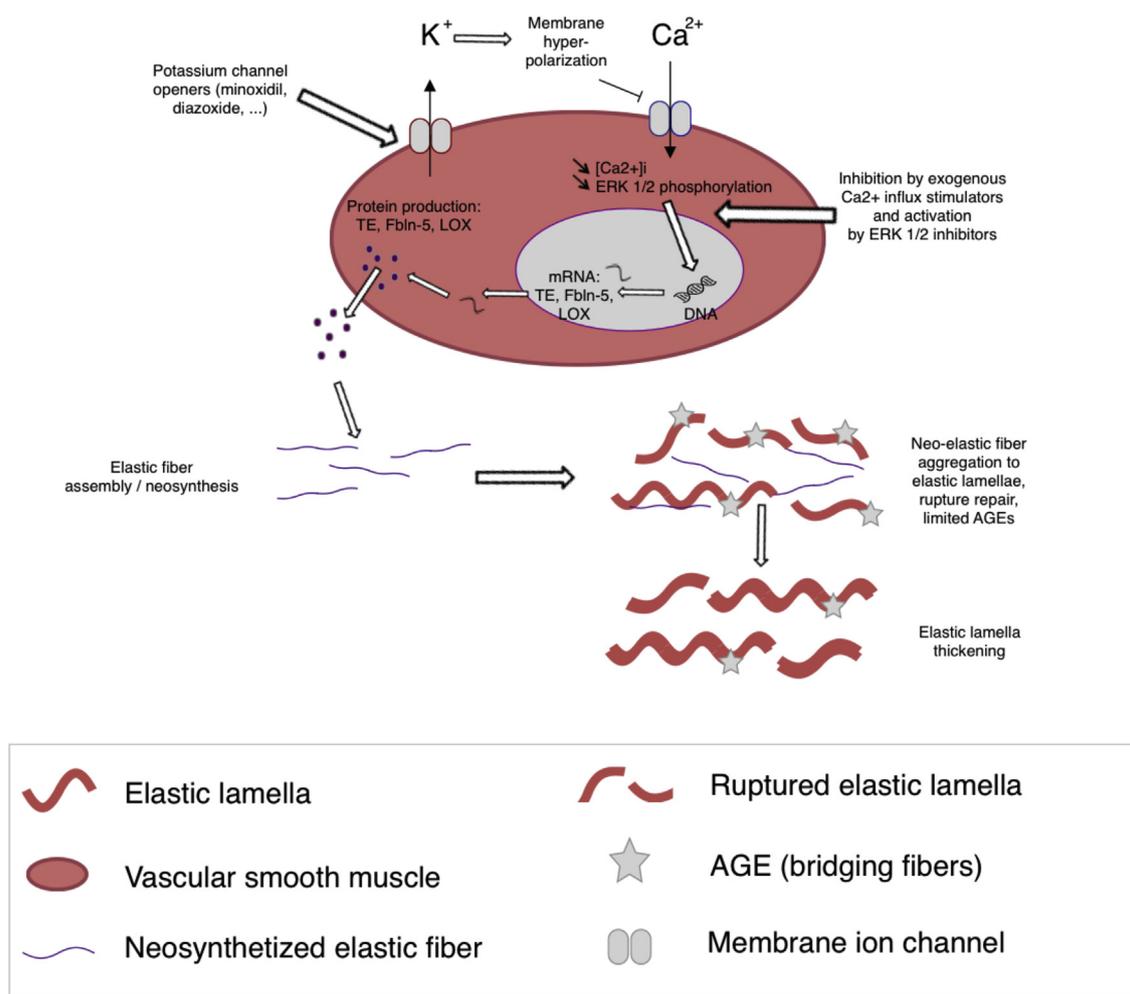
inhibition of cell proliferation and recovery of elastin production [165].

Completely different therapeutic strategies have also been tested to stimulate elastin synthesis using *in vitro* or *in vivo* models. Cenizo and colleagues have used a dill extract to induce LOXL gene expression in dermal fibroblasts, resulting in elastin content increase in dermal and skin equivalents as well as skin elasticity elevation *in vivo* in humans [166,167].

In addition, based on a previous work which has shown that microRNA (miR)-29 mimics downregulate the expression of elastin (ELN) as well as parts of collagen type I (COL1A1) and collagen type III (COL3A1) genes, the team of William C. Sessa has demonstrated that inhibition of miR-29a can increase ELN expression in human cells (skin fibroblasts, VSMCs, bioengineered vessels) and in cells from patients with ELN haploinsufficiencies (supravalvular aortic stenosis or Williams-Beuren syndrome). Using the same *in vitro* models, it was also demonstrated that engineered zinc-finger protein transcription factors that target the ELN gene can also be used to stimulate the expression of elastin [168,169]. However, these potential therapeutic molecules have not been tested *in vivo* yet and need additional investigations for validation of their therapeutic potential.

## Conclusion

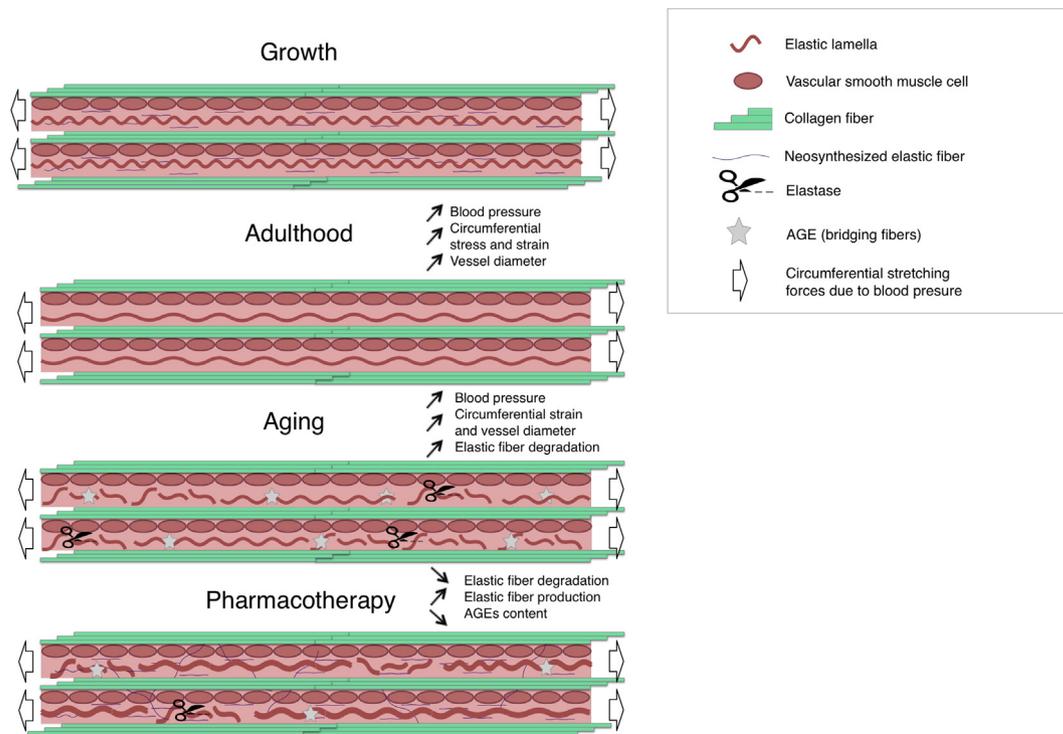
Elastic fibers represent a major innovation in the course of the evolution of species. Their mechanical properties of resilience and elasticity under relatively high strain-stress, together with the protective action of collagen fibers, have permitted the emergence of large arteries adapted for the efficient but also demanding close circulation of vertebrates. During development, the progressive expression and assembly of the elastic fiber components adapt the structure-function of the arteries to the changing mechanical requirements imposed by the constitution of the complex cardiovascular system. The stoppage at the end of childhood of the production of the main constituent of elastic fibers, elastin, therefore preventing further assembly of elastic fibers, results in the presence of a limited and non-reconstitutable stock of elastic fibers at the end of growth. During adulthood, the activity of proteolytic enzymes progressively degrades the existing elastic fibers and the arterial function, progressively leading to the deleterious elevated blood pressure, increased pulse pressure and altered hemodynamics observed during aging (Fig. 2). The impossibility to physiologically replace the degraded elastic fibers, *i.e.* repair the arterial wall and re-establish a normal function of elastic arteries, questions the reasons for the limitation in time of



**Fig. 1.** Cellular events and signaling pathways involved in elastic fiber neosynthesis induced by pharmacological treatments. Application of potassium channel openers to VSMCs leads to cell membrane hyperpolarization and calcium channel blockade. This induces a drop in intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration and inhibition of the ERK 1/2 pathway, resulting in the activation of the production of mRNAs involved in elastic fiber synthesis (tropoelastin, TE; fibulin-5, FBLN-5; lysyl-oxidase, LOX; fibrillin-1, FBN-1; ...) and secretion of the corresponding proteins. Treatment of the cells with an inhibitor of ERK 1/2 phosphorylation produces the same effect regarding elastin. Elastic fiber neosynthesis then precedes their integration/aggregation into pre-existing elastic fibers and elastic lamellae. Regarding the effect of minoxidil, a limitation of elastic fiber ruptures and AGE formation is also observed.

the elastic fiber production. Is it a simple illustration of the disposable soma theory of aging, postulating that our bodies are important only until transmission of the genes to the next generation, then become unimportant? The answer is possibly more complex and could rely on the fact that elastic fibers are assembled during development and, later on, are extended by the growth of the organs, which could be necessary for reaching their mature mechanical properties [31]. A production of arterial elastic fibers after the end of growth could result in permanently unextended fibers which would not present normal elastic properties, then would not be completely efficient for endowing the large arteries with the needed mechanical properties. This hypothesis is

supported by the fact that pharmacological reinduction of the expression of elastin and enzymes required for elastic fiber assembly, in the aorta of aged animals, results in the neosynthesis of elastic fibers that are not all normally arranged and oriented (Fig. 2). This has contrasted functional consequences: the return of the aorta stress-strain relation closer to that of young adults, although with a contrasted improvement of the aorta distensibility and stiffness, present in females, not males [157,159]. The search for new conditions allowing for elastic fiber arrangement and function optimization after elastin synthesis reinduction could be a future challenge in order to substantially improve the elasticity of large arteries in aged animals.



**Fig. 2.** Evolution of the arterial wall structure during development, adulthood, aging and pharmacotherapy. During development, elastic fiber deposition takes place in short size arteries, which are later extended by the progressive blood pressure elevation. The extension of elastic fiber leads to the conformation providing them with their normal mechanical properties. During adulthood and aging, cyclic mechanical stress and proteases trigger elastic fiber degradation, leading to failing mechanical properties and increased stiffness. Pharmacological treatments (e.g. minoxidil) in adult or aged mice stimulates the expression of the components allowing for elastic fiber assembly (e.g. tropoelastin, fibulin-5 and LOX), and neosynthesized elastic fibers are produced in the media, either aggregated to the pre-existing elastic lamellae (increased thickness of the elastic lamellae) or in the interlamellar spaces (under different orientations).

## Acknowledgments

The authors thank Dr. Ladislav Robert for his advices and decisive findings that he made in the field. We thank Corentin Caton for his help. Thanks also to the Association Autour des Williams (France), the Region Rhône-Alpes (France), the European Commission (grants TELASTAR, 5th PCRD, No. QLK6-CT-2001-00332 and ELAST-AGE, 6th PCRD, No. LSHM-CT-2005-018960) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR, France, grant Arterylastic: ANR-18-CE18-0001) for fundings.

Received 6 May 2019;

Received in revised form 3 August 2019;

Accepted 26 August 2019

Available online 04 September 2019

### Keywords:

Elastin - elastic fibers;  
Arteries;  
Signaling;

Development;  
Aging

Contributed equally.

## References

- [1] T.A. Cook, N.A. Salmo, P.O. Yates, The elasticity of the internal lamina, *J. Pathol.* 117 (1975) 253–258, <https://doi.org/10.1002/path.1711170408>.
- [2] M.R. Roach, A.C. Burton, The reason for the shape of the distensibility curves of arteries, *Can. J. Biochem. Physiol.* 35 (1957) 681–690.
- [3] H. Wolinsky, S. Glagov, Structural basis for the static mechanical properties of the aortic media, *Circ. Res.* 14 (1964) 400–413.
- [4] W.D. Tucker, K. Mahajan, *Anatomy, Blood Vessels*, in: StatPearls, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470401/>. (Accessed 25 April 2019).
- [5] M.P. Jacob, *Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and*

- pathological conditions, *Biomed. Pharmacother.* 57 (2003) 195–202.
- [6] C.M. Kelleher, S.E. McLean, R.P. Mecham, Vascular extracellular matrix and aortic development, *Curr. Top. Dev. Biol.* 62 (2004) 153–188, [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(04\)62006-0](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(04)62006-0).
- [7] A.K. Baldwin, A. Simpson, R. Steer, S.A. Cain, C.M. Kielty, Elastic fibres in health and disease, *Expert Rev. Mol. Med.* 15 (2013), e8, <https://doi.org/10.1017/erm.2013.9>.
- [8] L. Debelle, A.M. Tamburro, Elastin: molecular description and function, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31 (1999) 261–272.
- [9] M.A. Lillie, G.J. David, J.M. Gosline, Mechanical role of elastin-associated microfibrils in pig aortic elastic tissue, *Connect. Tissue Res.* 37 (1998) 121–141.
- [10] H. Yanagisawa, J. Wagenseil, Elastic fibers and biomechanics of the aorta: insights from mouse studies, *Matrix Biol.* 2019, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2019.03.001>.
- [11] G. Faury, Function-structure relationship of elastic arteries in evolution: from microfibrils to elastin and elastic fibres, *Pathol. Biol. (Paris)*. 49 (2001) 310–325.
- [12] J.E. Wagenseil, R.P. Mecham, Vascular extracellular matrix and arterial mechanics, *Physiol. Rev.* 89 (2009) 957–989, <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2008>.
- [13] S. Laurent, J. Cockcroft, L. Van Bortel, P. Boutouyrie, C. Giannattasio, D. Hayoz, B. Pannier, C. Vlachopoulos, I. Wilkinson, H. Struijker-Boudier, European network for non-invasive investigation of large arteries, expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications, *Eur. Heart J.* 27 (2006) 2588–2605, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehl254>.
- [14] H. Wolinsky, S. Glagov, A lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals, *Circ. Res.* 20 (1967) 99–111.
- [15] D.M. Basalyga, D.T. Simionescu, W. Xiong, B.T. Baxter, B.C. Starcher, N.R. Vyavahare, Elastin degradation and calcification in an abdominal aorta injury model: role of matrix metalloproteinases, *Circulation*. 110 (2004) 3480–3487, <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000148367.08413.E9>.
- [16] S.E. Greenwald, Ageing of the conduit arteries, *J. Pathol.* 211 (2007) 157–172, <https://doi.org/10.1002/path.2101>.
- [17] S. Hodis, M. Zamir, Mechanical events within the arterial wall: the dynamic context for elastin fatigue, *J. Biomech.* 42 (2009) 1010–1016, <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.02.010>.
- [18] L. de R. Mikael, A.M.G. de Paiva, M.M. Gomes, A.L.L. Sousa, P.C.B.V. Jardim, P.V. de O. Vitorino, M.B. Euzébio, W. de M. Sousa, W.K.S. Barroso, Vascular Aging and Arterial Stiffness, *Arq. Bras. Cardiol.* 109 (2017) 253–258. doi:<https://doi.org/10.5935/abc.20170091>.
- [19] M. Janić, M. Lunder, M. Sabovič, Arterial stiffness and cardiovascular therapy, *Biomed. Res. Int.* 2014 (2014) 621437, <https://doi.org/10.1155/2014/621437>.
- [20] M. Cecelja, P. Chowienczyk, Role of arterial stiffness in cardiovascular disease, *JRSM Cardiovasc. Dis.* 1 (2012). doi:<https://doi.org/10.1258/cvd.2012.012016>.
- [21] H. Astrand, J. Stalhand, J. Karlsson, M. Karlsson, B. Sonesson, T. Länne, In vivo estimation of the contribution of elastin and collagen to the mechanical properties in the human abdominal aorta: effect of age and sex, *J. Appl. Physiol.* 1985 (110) (2011) 176–187, <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00579.2010>.
- [22] S. Bonapace, A. Rossi, M. Ciccoira, G. Targher, F. Valbusa, A. Benetos, C. Vassanelli, Increased aortic pulse wave velocity as measured by echocardiography is strongly associated with poor prognosis in patients with heart failure, *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 26 (2013) 714–720, <https://doi.org/10.1016/j.echo.2013.03.022>.
- [23] M. Husmann, V. Jacomella, C. Thalhammer, B.R. Amann-Vesti, Markers of arterial stiffness in peripheral arterial disease, *VASA* 44 (2015) 341–348, <https://doi.org/10.1024/0301-1526/a000452>.
- [24] M. Kozakova, C. Morizzo, D. Guarino, G. Federico, M. Miccoli, C. Giannattasio, C. Palombo, The impact of age and risk factors on carotid and carotid-femoral pulse wave velocity, *J. Hypertens.* 33 (2015) 1446–1451, <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000000582>.
- [25] S. Novella, A.P. Dantas, G. Segarra, P. Medina, C. Hermenegildo, Vascular aging in women: is estrogen the fountain of youth? *Front. Physiol.* 3 (2012) 165, <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00165>.
- [26] B. Jani, C. Rajkumar, Ageing and vascular ageing, *Postgrad. Med. J.* 82 (2006) 357–362, <https://doi.org/10.1136/pgmj.2005.036053>.
- [27] A.A. Ahimastos, M. Formosa, A.M. Dart, B.A. Kingwell, Gender differences in large artery stiffness pre- and post puberty, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88 (2003) 5375–5380, <https://doi.org/10.1210/jc.2003-030722>.
- [28] H.-Y. Lee, B.-H. Oh, Aging and arterial stiffness, *Circ. J.* 74 (2010) 2257–2262.
- [29] R.B. Hickler, Aortic and large artery stiffness: current methodology and clinical correlations, *Clin. Cardiol.* 13 (1990) 317–322.
- [30] T.K. Waddell, A.M. Dart, C.D. Gatzka, J.D. Cameron, B.A. Kingwell, Women exhibit a greater age-related increase in proximal aortic stiffness than men, *J. Hypertens.* 19 (2001) 2205–2212.
- [31] J.D. Humphrey, E.R. Dufresne, M.A. Schwartz, Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (2014) 802–812, <https://doi.org/10.1038/nrm3896>.
- [32] H. van Meurs-van Woezik, H.W. Klein, L. Markus-Silvis, P. Krediet, Comparison of the growth of the tunica media of the ascending aorta, aortic isthmus and descending aorta in infants and children, *J. Anat.* 136 (1983) 273–281.
- [33] S. Basu, B.N. Datta, N. Khandelwal, Morphologic changes in pulmonary vasculature with arteriographic correlation, *Angiology.* 47 (1996) 375–380, <https://doi.org/10.1177/000331979604700408>.
- [34] A.J. Lilly, A. Mazan, D.A. Scott, G. Lacaud, V. Kouskoff, SOX7 expression is critically required in FLK1-expressing cells for vasculogenesis and angiogenesis during mouse embryonic development, *Mech. Dev.* 146 (2017) 31–41, <https://doi.org/10.1016/j.mod.2017.05.004>.
- [35] Y. Oike, Y. Ito, K. Hamada, X.-Q. Zhang, K. Miyata, F. Arai, T. Inada, K. Araki, N. Nakagata, M. Takeya, Y.Y. Kisanuki, M. Yanagisawa, N.W. Gale, T. Suda, Regulation of vasculogenesis and angiogenesis by EphB/ephrin-B2 signaling between endothelial cells and surrounding mesenchymal cells, *Blood.* 100 (2002) 1326–1333.
- [36] C.S. Craft, T.J. Broekelmann, R.P. Mecham, Microfibril-associated glycoproteins MAGP-1 and MAGP-2 in disease, *Matrix Biol.* 71–72 (2018) 100–111, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.03.006>.
- [37] M. Sauvage, N. Hinglais, C. Mandet, C. Badier, F. Deslandes, J.B. Michel, M.P. Jacob, Localization of elastin mRNA and TGF-beta1 in rat aorta and caudal artery as a function of age, *Cell Tissue Res.* 291 (1998) 305–314.

- [38] J.E. Wagenseil, R.P. Mecham, New insights into elastic fiber assembly, *Birth Defects Res. C Embryo Today* 81 (2007) 229–240, <https://doi.org/10.1002/bdrc.20111>.
- [39] H. Nakamura, Electron microscopic study of the prenatal development of the thoracic aorta in the rat, *Am. J. Anat.* 181 (1988) 406–418, <https://doi.org/10.1002/aja.1001810409>.
- [40] Y. Fukuda, V.J. Ferrans, R.G. Crystal, Development of elastic fibers of nuchal ligament, aorta, and lung of fetal and postnatal sheep: an ultrastructural and electron microscopic immunohistochemical study, *Am. J. Anat.* 170 (1984) 597–629, <https://doi.org/10.1002/aja.1001700407>.
- [41] R.P. Mecham, Elastin in lung development and disease pathogenesis, *Matrix Biol.* 73 (2018) 6–20, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.01.005>.
- [42] D.Y. Li, B. Brooke, E.C. Davis, R.P. Mecham, L.K. Sorensen, B.B. Boak, E. Eichwald, M.T. Keating, Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis, *Nature*. 393 (1998) 276–280, <https://doi.org/10.1038/30522>.
- [43] S.K. Karnik, B.S. Brooke, A. Bayes-Genis, L. Sorensen, J.D. Wythe, R.S. Schwartz, M.T. Keating, D.Y. Li, A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease, *Development* 130 (2003) 411–423.
- [44] S.K. Karnik, J.D. Wythe, L. Sorensen, B.S. Brooke, L.D. Urness, D.Y. Li, Elastin induces myofibrillogenesis via a specific domain, VGVAPG, *Matrix Biol.* 22 (2003) 409–425.
- [45] M. Gabriela Espinosa, M. Catalin Staiculescu, J. Kim, E. Marin, J.E. Wagenseil, Elastic fibers and large artery mechanics in animal models of development and disease, *J. Biomech. Eng.* 140 (2018). <https://doi.org/10.1115/1.4038704>.
- [46] S.M. Wells, B.L. Langille, S.L. Adamson, In vivo and in vitro mechanical properties of the sheep thoracic aorta in the perinatal period and adulthood, *Am. J. Physiol.* 274 (1998) H1749–H1760, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.274.5.H1749>.
- [47] S.M. Wells, B.L. Langille, J.M. Lee, S.L. Adamson, Determinants of mechanical properties in the developing ovine thoracic aorta, *Am. J. Physiol.* 277 (1999) H1385–H1391, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1999.277.4.H1385>.
- [48] C.L. Berry, T. Looker, J. Germain, Nucleic acid and scleroprotein content of the developing human aorta, *J. Pathol.* 108 (1972) 265–274, <https://doi.org/10.1002/path.1711080402>.
- [49] S.E. Greenwald, C.L. Berry, S.G. Haworth, Changes in the distensibility of the intrapulmonary arteries in the normal newborn and growing pig, *Cardiovasc. Res.* 16 (1982) 716–725.
- [50] P.M. Vanhoutte, H. Shimokawa, M. Feletou, E.H.C. Tang, Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update, *Acta Physiol. (Oxf)*. 219 (2017) 22–96, <https://doi.org/10.1111/apha.12646>.
- [51] H. Sugitani, H. Wachi, S. Tajima, Y. Seyama, Nitric oxide stimulates elastin expression in chick aortic smooth muscle cells, *Biol. Pharm. Bull.* 24 (2001) 461–464.
- [52] H.Y. Qiu, B. Valtier, H.A. Struyker-Boudier, B.I. Levy, Mechanical and contractile properties of in situ localized mesenteric arteries in normotensive and spontaneously hypertensive rats, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 33 (1995) 159–170.
- [53] F.L. Wuyts, V.J. Vanhuyse, G.J. Langewouters, W.F. Decraemer, E.R. Raman, S. Buyle, Elastic properties of human aortas in relation to age and atherosclerosis: a structural model, *Phys. Med. Biol.* 40 (1995) 1577–1597.
- [54] P.B. Dobrin, A.A. Rovick, Influence of vascular smooth muscle on contractile mechanics and elasticity of arteries, *Am. J. Physiol.* 217 (1969) 1644–1651, <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1969.217.6.1644>.
- [55] G. Faury, G.M. Maher, D.Y. Li, M.T. Keating, R.P. Mecham, W.A. Boyle, Relation between outer and luminal diameter in cannulated arteries, *Am. J. Physiol.* 277 (1999) H1745–H1753, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1999.277.5.H1745>.
- [56] J.M. Davidson, O. Zoia, J.M. Liu, Modulation of transforming growth factor-beta 1 stimulated elastin and collagen production and proliferation in porcine vascular smooth muscle cells and skin fibroblasts by basic fibroblast growth factor, transforming growth factor-alpha, and insulin-like growth factor-I, *J. Cell. Physiol.* 155 (1993) 149–156, <https://doi.org/10.1002/jcp.1041550119>.
- [57] T.E. Clark, M.A. Lillie, A.W. Vogl, J.M. Gosline, R.E. Shadwick, Mechanical contribution of lamellar and interlamellar elastin along the mouse aorta, *J. Biomech.* 48 (2015) 3599–3605, <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2015.08.004>.
- [58] B.B. Aaron, J.M. Gosline, Elastin as a random-network elastomer: a mechanical and optical analysis of single elastin fibers, *Biopolymers.* 20 (1981) 1247–1260, <https://doi.org/10.1002/bip.1981.360200611>.
- [59] M.-J. Chow, R. Turcotte, C.P. Lin, Y. Zhang, Arterial extracellular matrix: a mechanobiological study of the contributions and interactions of elastin and collagen, *Biophys. J.* 106 (2014) 2684–2692, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.05.014>.
- [60] J. Rosenbloom, W.R. Abrams, R. Mecham, Extracellular matrix 4: the elastic fiber, *FASEB J.* 7 (1993) 1208–1218.
- [61] M.A. Awal, M. Matsumoto, H. Nishinakagawa, Morphometrical changes of the arterial walls of main arteries from heart to the abdomino-inguinal mammary glands of rat from virgin through pregnancy, lactation and post-weaning, *J. Vet. Med. Sci.* 57 (1995) 251–256.
- [62] O. Fritze, B. Romero, M. Schleicher, M.P. Jacob, D.-Y. Oh, B. Starcher, K. Schenke-Layland, J. Bujan, U.A. Stock, Age-related changes in the elastic tissue of the human aorta, *J. Vasc. Res.* 49 (2012) 77–86, <https://doi.org/10.1159/000331278>.
- [63] T. Fülöp, S.M. Wei, L. Robert, M.P. Jacob, Determination of elastin peptides in normal and arteriosclerotic human sera by ELISA, *Clin. Physiol. Biochem.* 8 (1990) 273–282.
- [64] G. Faury, Role of the elastin-laminin receptor in the cardiovascular system, *Pathol. Biol. (Paris)*. 46 (1998) 517–526.
- [65] G. Faury, Y. Usson, M. Robert-Nicoud, L. Robert, J. Verdetti, Nuclear and cytoplasmic free calcium level changes induced by elastin peptides in human endothelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 2967–2972.
- [66] A. Ostuni, M.D. Lograno, A.R. Gasbarro, F. Bisaccia, A.M. Tamburro, Novel properties of peptides derived from the sequence coded by exon 26A of human elastin, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34 (2002) 130–135.
- [67] M.D. Lograno, F. Bisaccia, A. Ostuni, E. Daniele, A.M. Tamburro, Identification of elastin peptides with vasorelaxant activity on rat thoracic aorta, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30 (1998) 497–503.

- [68] G. Faury, M.T. Ristori, J. Verdeti, M.P. Jacob, L. Robert, Effect of elastin peptides on vascular tone, *J. Vasc. Res.* 32 (1995) 112–119, <https://doi.org/10.1159/000159084>.
- [69] M.E. Curran, D.L. Atkinson, A.K. Ewart, C.A. Morris, M.F. Leppert, M.T. Keating, The elastin gene is disrupted by a translocation associated with supraaortic stenosis, *Cell.* 73 (1993) 159–168.
- [70] A.K. Ewart, C.A. Morris, D. Atkinson, W. Jin, K. Sternes, P. Spallone, A.D. Stock, M. Leppert, M.T. Keating, Hemizygoty at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome, *Nat. Genet.* 5 (1993) 11–16, <https://doi.org/10.1038/ng0993-11>.
- [71] G. Faury, M. Pezet, R.H. Knutsen, W.A. Boyle, S.P. Heximer, S.E. McLean, R.K. Minkes, K.J. Blumer, A. Kovacs, D.P. Kelly, D.Y. Li, B. Starcher, R.P. Mecham, Developmental adaptation of the mouse cardiovascular system to elastin haploinsufficiency, *J. Clin. Invest.* 112 (2003) 1419–1428, <https://doi.org/10.1172/JCI19028>.
- [72] M.L. Duque Lasio, B.A. Kozel, Elastin-driven genetic diseases, *Matrix Biol.* 71–72 (2018) 144–160, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.02.021>.
- [73] H.C. Dietz, G.R. Cutting, R.E. Pyeritz, C.L. Maslen, L.Y. Sakai, G.M. Corson, E.G. Puffenberger, A. Hamosh, E.J. Nanthakumar, S.M. Curristin, Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene, *Nature.* 352 (1991) 337–339, <https://doi.org/10.1038/352337a0>.
- [74] F. Ramirez, C. Caescu, E. Wondimu, J. Galatioto, Marfan syndrome; A connective tissue disease at the crossroads of mechanotransduction, TGF $\beta$  signaling and cell stemness, *Matrix Biol.* 71–72 (2018) 82–89, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.07.004>.
- [75] G.F. Mitchell, Effects of central arterial aging on the structure and function of the peripheral vasculature: implications for end-organ damage, *J. Appl. Physiol.* 1985 (105) (2008) 1652–1660, <https://doi.org/10.1152/japophysiol.90549.2008>.
- [76] M.F. O'Rourke, J. Hashimoto, Mechanical factors in arterial aging: a clinical perspective, *J. Am. Coll. Cardiol.* 50 (2007) 1–13, <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.12.050>.
- [77] M.J. Sherratt, Tissue elasticity and the ageing elastic fibre, *Age.* 31 (2009) 305–325, <https://doi.org/10.1007/s11357-009-9103-6>.
- [78] J. Labat-Robert, M. Bihari-Varga, L. Robert, Extracellular matrix, *FEBS Lett.* 268 (1990) 386–393.
- [79] M.A. Lillie, G.W. Chalmers, J.M. Gosline, The effects of heating on the mechanical properties of arterial elastin, *Connect. Tissue Res.* 31 (1994) 23–35.
- [80] N. Thorin-Trescases, E. Thorin, Lifelong cyclic mechanical strain promotes large elastic artery stiffening: increased pulse pressure and old age-related organ failure, *Can. J. Cardiol.* 32 (2016) 624–633, <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2015.12.022>.
- [81] C. Palombo, M. Kozakova, Arterial stiffness, atherosclerosis and cardiovascular risk: pathophysiologic mechanisms and emerging clinical indications, *Vascul. Pharmacol.* 77 (2016) 1–7, <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.11.083>.
- [82] M.E. Safar, Arterial aging—hemodynamic changes and therapeutic options, *Nat. Rev. Cardiol.* 7 (2010) 442–449, <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2010.96>.
- [83] D.R. Sell, V.M. Monnier, Molecular basis of arterial stiffening: role of glycation - a mini-review, *Gerontology.* 58 (2012) 227–237, <https://doi.org/10.1159/000334668>.
- [84] G.L. Bakris, A.J. Bank, D.A. Kass, J.M. Neutel, R.A. Preston, S. Oparil, Advanced glycation end-product cross-link breakers. A novel approach to cardiovascular pathologies related to the aging process, *Am. J. Hypertens.* 17 (2004) 23S–30S. doi:<https://doi.org/10.1016/j.amjhyper.2004.08.022>.
- [85] M. Kosmopoulos, D. Drekolias, P.D. Zavras, C. Piperi, A.G. Papavassiliou, Impact of advanced glycation end products (AGEs) signaling in coronary artery disease, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Mol. Basis Dis.* 1865 (2019) 611–619, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.01.006>.
- [86] C. Cantini, P. Kieffer, B. Corman, P. Limiñana, J. Atkinson, I. Lartaud-Idjouadiene, Aminoguanidine and aortic wall mechanics, structure, and composition in aged rats, *Hypertension* 38 (2001) 943–948.
- [87] S. Peng, J. Glennert, P. Westermark, Medin-amyloid: a recently characterized age-associated arterial amyloid form affects mainly arteries in the upper part of the body, *Amyloid.* 12 (2005) 96–102, <https://doi.org/10.1080/13506120500107006>.
- [88] L. Robert, A.M. Robert, T. Fülöp, Rapid increase in human life expectancy: will it soon be limited by the aging of elastin? *Biogerontology.* 9 (2008) 119–133, <https://doi.org/10.1007/s10522-007-9122-6>.
- [89] S. Chakraborti, M. Mandal, S. Das, A. Mandal, T. Chakraborti, Regulation of matrix metalloproteinases: an overview, *Mol. Cell. Biochem.* 253 (2003) 269–285.
- [90] E. Allaire, B. Muscatelli-Groux, C. Mandet, A.-M. Guinault, P. Bruneval, P. Desgranges, A. Clowes, D. Mélière, J.-P. Bequemin, Paracrine effect of vascular smooth muscle cells in the prevention of aortic aneurysm formation, *J. Vasc. Surg.* 36 (2002) 1018–1026.
- [91] M.A. Cattell, J.C. Anderson, P.S. Hasleton, Age-related changes in amounts and concentrations of collagen and elastin in normotensive human thoracic aorta, *Clin. Chim. Acta* 245 (1996) 73–84.
- [92] H. Taghizadeh, M. Tafazzoli-Shadpour, Characterization of mechanical properties of lamellar structure of the aortic wall: effect of aging, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 65 (2017) 20–28, <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.08.011>.
- [93] A. Schmidt-Trucksäss, D. Grathwohl, A. Schmid, R. Boragk, C. Upmeier, J. Keul, M. Huonker, Structural, functional, and hemodynamic changes of the common carotid artery with age in male subjects, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19 (1999) 1091–1097.
- [94] A. Wahart, T. Hocine, C. Albrecht, A. Henry, T. Sarazin, L. Martiny, H. El Btaouri, P. Maurice, A. Bennasroune, B. Romier-Crouzet, S. Blaise, L. Duca, Role of elastin peptides and elastin receptor complex in metabolic and cardiovascular diseases, *FEBS J* 286 (2019) 2980–2993, <https://doi.org/10.1111/febs.14836>.
- [95] G. Faury, S. Garnier, A.S. Weiss, J. Wallach, T. Fülöp, M.P. Jacob, R.P. Mecham, L. Robert, J. Verdeti, Action of tropoelastin and synthetic elastin sequences on vascular tone and on free Ca<sup>2+</sup> level in human vascular endothelial cells, *Circ. Res.* 82 (1998) 328–336.
- [96] Z. Varga, M.P. Jacob, L. Robert, J. Csongor, T. Fulop, Age-dependent changes of K-elastin stimulated effector functions of human phagocytic cells: relevance for atherogenesis, *Exp. Gerontol.* 32 (1997) 653–662.
- [97] T. Fülöp, N. Douziech, M.P. Jacob, M. Hauck, J. Wallach, L. Robert, Age-related alterations in the signal transduction

- pathways of the elastin-laminin receptor, *Pathol. Biol. (Paris)*. 49 (2001) 339–348.
- [98] G. Faury, A. Chabaud, M.T. Ristori, L. Robert, J. Verdetti, Effect of age on the vasodilatory action of elastin peptides, *Mech. Ageing Dev.* 95 (1997) 31–42.
- [99] G. Faury, L. Robert, J. Verdetti, The age-dependent vasodilatation and endothelial calcium influx induced by elastin peptides are modulated by extracellular glucose level, *Biomed. Pharmacother.* 57 (2003) 216–222, [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(03\)00053-2](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(03)00053-2).
- [100] L. Robert, Aging of the vascular wall and atherogenesis: role of the elastin-laminin receptor, *Atherosclerosis*. 123 (1996) 169–179.
- [101] J. Ferruzzi, M.R. Bersi, R.P. Mecham, F. Ramirez, H. Yanagisawa, G. Tellides, J.D. Humphrey, Loss of elastic fiber integrity compromises common carotid artery function: implications for vascular aging, *Artery Res.* 14 (2016) 41–52, <https://doi.org/10.1016/j.artres.2016.04.001>.
- [102] B. Mariko, M. Pezet, B. Escoubet, S. Bouillot, J.-P. Andrieu, B. Starcher, D. Quagliano, M.-P. Jacob, P. Huber, F. Ramirez, G. Faury, Fibrillin-1 genetic deficiency leads to pathological ageing of arteries in mice, *J. Pathol.* 224 (2011) 33–44, <https://doi.org/10.1002/path.2840>.
- [103] M. Pezet, M.-P. Jacob, B. Escoubet, D. Gheduzzi, E. Tillet, P. Perret, P. Huber, D. Quagliano, R. Vranckx, D.Y. Li, B. Starcher, W.A. Boyle, R.P. Mecham, G. Faury, Elastin haploinsufficiency induces alternative aging processes in the aorta, *Rejuvenation Res.* 11 (2008) 97–112, <https://doi.org/10.1089/rej.2007.0587>.
- [104] A. Doyon, D. Kracht, A.K. Bayazit, M. Deveci, A. Duzova, R.T. Krmar, M. Litwin, A. Niemirska, B. Oguz, B.M.W. Schmidt, B. Sözeri, U. Querfeld, A. Melk, F. Schaefer, E. Wühl, 4C Study Consortium, Carotid artery intima-media thickness and distensibility in children and adolescents: reference values and role of body dimensions, *Hypertension* 62 (2013) 550–556, <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01297>.
- [105] D.H.J. Thijssen, S.E. Carter, D.J. Green, Arterial structure and function in vascular ageing: are you as old as your arteries? *J. Physiol.* 594 (2016) 2275–2284, <https://doi.org/10.1113/JP270597>.
- [106] P.M. Nilsson, P. Boutouyrie, P. Cunha, V. Kotsis, K. Narkiewicz, G. Parati, E. Rietzschel, A. Scuteri, S. Laurent, Early vascular ageing in translation: from laboratory investigations to clinical applications in cardiovascular prevention, *J. Hypertens.* 31 (2013) 1517–1526, <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e328361e4bd>.
- [107] A.H. Davies, The seriousness of chronic venous disease: a review of real-world evidence, *Adv. Ther.* 36 (2019) 5–12, <https://doi.org/10.1007/s12325-019-0881-7>.
- [108] J.A. Elefteriades, E.A. Farkas, Thoracic aortic aneurysm clinically pertinent controversies and uncertainties, *J. Am. Coll. Cardiol.* 55 (2010) 841–857, <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.08.084>.
- [109] E. Altobelli, L. Rapacchietta, V.F. Profeta, R. Fagnano, Risk factors for abdominal aortic aneurysm in population-based studies: a systematic review and meta-analysis, *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 15 (2018). doi:<https://doi.org/10.3390/ijerph15122805>.
- [110] H. Abdulameer, H. Al Taii, S.G. Al-Kindi, R. Milner, Epidemiology of fatal ruptured aortic aneurysms in the United States (1999–2016), *J. Vasc. Surg.* 69 (2019) 378–384.e2. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jvs.2018.03.435>.
- [111] S. Barquera, A. Pedroza-Tobías, C. Medina, L. Hernández-Barrera, K. Bibbins-Domingo, R. Lozano, A.E. Moran, Global overview of the epidemiology of atherosclerotic cardiovascular disease, *Arch. Med. Res.* 46 (2015) 328–338, <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2015.06.006>.
- [112] E.G. Lakatta, D. Levy, Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: part I: aging arteries: a “set up” for vascular disease, *Circulation*. 107 (2003) 139–146, <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000048892.83521.58>.
- [113] G.K. Hansson, Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease, *N. Engl. J. Med.* 352 (2005) 1685–1695, <https://doi.org/10.1056/NEJMr043430>.
- [114] P. Lévy, M. Kohler, W.T. McNicholas, F. Barbé, R.D. McEvoy, V.K. Somers, L. Lavie, J.-L. Pépin, Obstructive sleep apnoea syndrome, *Nat. Rev. Dis. Primer.* 1 (2015) 15015, <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.15>.
- [115] C. Arnaud, P.C. Beguin, S. Lantuejoul, J.-L. Pepin, C. Guillemet, G. Pelli, F. Burger, V. Buatois, C. Ribuot, J.-P. Baguet, F. Mach, P. Levy, M. Dematteis, The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184 (2011) 724–731, <https://doi.org/10.1164/rccm.201012-2033OC>.
- [116] S. Iurciuc, A.M. Cimpean, F. Mitu, R. Heredea, M. Iurciuc, Vascular aging and subclinical atherosclerosis: why such a “never ending” and challenging story in cardiology? *Clin. Interv. Aging* 12 (2017) 1339–1345, <https://doi.org/10.2147/CIA.S141265>.
- [117] M. Wang, R.E. Monticone, K.R. McGraw, Proinflammatory arterial stiffness syndrome: a signature of large arterial aging, *J. Vasc. Res.* 55 (2018) 210–223, <https://doi.org/10.1159/000490244>.
- [118] L. Rodríguez-Mañas, M. El-Assar, S. Vallejo, P. López-Dóriga, J. Solís, R. Petidier, M. Montes, J. Nevado, M. Castro, C. Gómez-Guerrero, C. Peiró, C.F. Sánchez-Ferrer, Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation, *Aging Cell* 8 (2009) 226–238, <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00466.x>.
- [119] G.K. Sukhova, G.P. Shi, D.I. Simon, H.A. Chapman, P. Libby, Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells, *J. Clin. Invest.* 102 (1998) 576–583, <https://doi.org/10.1172/JCI1181>.
- [120] J. Huynh, N. Nishimura, K. Rana, J.M. Peloquin, J.P. Califano, C.R. Montague, M.R. King, C.B. Schaffer, C.A. Reinhart-King, Age-related intimal stiffening enhances endothelial permeability and leukocyte transmigration, *Sci. Transl. Med.* 3 (2011) 112–122, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002761>.
- [121] L. González-Santiago, S. López-Ongil, M. Rodríguez-Puyol, D. Rodríguez-Puyol, Decreased nitric oxide synthesis in human endothelial cells cultured on type I collagen, *Circ. Res.* 90 (2002) 539–545, <https://doi.org/10.1161/01.res.0000012445.68979.9d>.
- [122] A.W. Orr, M.Y. Lee, J.A. Lemmon, A. Yurdagul, M.F. Gomez, P.D.S. Bortz, B.R. Wamhoff, Molecular mechanisms of collagen isotype-specific modulation of smooth muscle cell phenotype, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29 (2009) 225–231, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.178749>.
- [123] T. Fulop, A. Larbi, A. Fortun, L. Robert, A. Khalil, Elastin peptides induced oxidation of LDL by phagocytic cells,

- Pathol. Biol. (Paris). 53 (2005) 416–423, <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2004.12.023>.
- [124] P. Maurice, S. Blaise, S. Gayral, L. Debelle, M. Laffargue, W. Homebeck, L. Duca, Elastin fragmentation and atherosclerosis progression: the elastokine concept, *Trends Cardiovasc. Med.* 23 (2013) 211–221, <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2012.12.004>.
- [125] A. Phinikaridou, S. Lacerda, B. Lavin, M.E. Andia, A. Smith, P. Saha, R.M. Botnar, Tropoelastin: a novel marker for plaque progression and instability, *Circ. Cardiovasc. Imaging* 11 (2018), <https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.117.007303>.
- [126] D.A. Chistiakov, A.N. Orekhov, Y.V. Bobryshev, Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis, *Acta Physiol. (Oxf)* 214 (2015) 33–50, <https://doi.org/10.1111/apha.12466>.
- [127] A.J. Cocciolone, J.Z. Hawes, M.C. Staiculescu, E.O. Johnson, M. Murshed, J.E. Wagenseil, Elastin, arterial mechanics, and cardiovascular disease, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 315 (2018) H189–H205, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00087.2018>.
- [128] M. Wang, L. Jiang, R.E. Monticone, E.G. Lakatta, Proinflammation: the key to arterial aging, *Trends Endocrinol. Metab.* 25 (2014) 72–79, <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.10.002>.
- [129] M. Wang, E.G. Lakatta, Altered regulation of matrix metalloproteinase-2 in aortic remodeling during aging, *Hypertension* 39 (2002) 865–873, <https://doi.org/10.1161/01.hyp.0000014506.13322.66>.
- [130] K.W. Johnston, R.B. Rutherford, M.D. Tilson, D.M. Shah, L. Hollier, J.C. Stanley, Suggested standards for reporting on arterial aneurysms. Subcommittee on Reporting Standards for Arterial Aneurysms, Ad Hoc Committee on Reporting Standards, Society for Vascular Surgery and North American Chapter, International Society for Cardiovascular Surgery, *J. Vasc. Surg.* 13 (1991) 452–458.
- [131] E.L. Verhoeven, M.R. Kapma, H. Groen, I.F. Tielliu, C.J. Zeebregts, F. Bekkema, J.J. van den Dungen, Mortality of ruptured abdominal aortic aneurysm treated with open or endovascular repair, *J. Vasc. Surg.* 48 (2008) 1396–1400, <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2008.07.054>.
- [132] N. Sakalihasan, J.-B. Michel, A. Katsargyris, H. Kuivaniemi, J.-O. Defraigne, A. Nchimi, J.T. Powell, K. Yoshimura, R. Hultgren, Abdominal aortic aneurysms, *Nat. Rev. Dis. Primer.* 4 (2018) 34, <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0030-7>.
- [133] J.-B. Michel, G. Jondeau, D.M. Milewicz, From genetics to response to injury: vascular smooth muscle cells in aneurysms and dissections of the ascending aorta, *Cardiovasc. Res.* 114 (2018) 578–589, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy006>.
- [134] A. Malashicheva, D. Kostina, A. Kostina, O. Irtyuga, I. Voronkina, L. Smagina, E. Ignatieva, N. Gavriluk, V. Uspensky, O. Moiseeva, J. Vaage, A. Kostareva, Phenotypic and functional changes of endothelial and smooth muscle cells in thoracic aortic aneurysms, *Int. J. Vasc. Med.* 2016 (2016) 3107879, <https://doi.org/10.1155/2016/3107879>.
- [135] S.W. Rabkin, The role matrix metalloproteinases in the production of aortic aneurysm, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 147 (2017) 239–265, <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.02.002>.
- [136] G. Ailawadi, J.L. Eliason, G.R. Upchurch, Current concepts in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm, *J. Vasc. Surg.* 38 (2003) 584–588.
- [137] U. Raaz, A.M. Zöllner, I.N. Schellinger, R. Toh, F. Nakagami, M. Brandt, F.C. Emrich, Y. Kayama, S. Eken, M. Adam, L. Maegdefessel, T. Hertel, A. Deng, A. Jagger, M. Buerke, R.L. Dalman, J.M. Spin, E. Kuhl, P.S. Tsao, Segmental aortic stiffening contributes to experimental abdominal aortic aneurysm development, *Circulation*. 131 (2015) 1783–1795, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.012377>.
- [138] S.A. Gharib, A.M. Manicone, W.C. Parks, Matrix metalloproteinases in emphysema, *Matrix Biol.* 73 (2018) 34–51, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.01.018>.
- [139] A. Ferrara, S. Morganti, P. Totaro, A. Mazzola, F. Auricchio, Human dilated ascending aorta: mechanical characterization via uniaxial tensile tests, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 53 (2016) 257–271, <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.08.021>.
- [140] C.J. Goergen, J. Azuma, K.N. Barr, L. Magdefessel, D.Y. Kallop, A. Gogineni, A. Grewall, R.M. Weimer, A.J. Connolly, R.L. Dalman, C.A. Taylor, P.S. Tsao, J.M. Greve, Influences of aortic motion and curvature on vessel expansion in murine experimental aneurysms, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31 (2011) 270–279, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.216481>.
- [141] A. Karimi, D.M. Milewicz, Structure of the elastin-contractile units in the thoracic aorta and how genes that cause thoracic aortic aneurysms and dissections disrupt this structure, *Can. J. Cardiol.* 32 (2016) 26–34, <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2015.11.004>.
- [142] A. Tsamis, J.T. Krawiec, D.A. Vorp, Elastin and collagen fibre microstructure of the human aorta in ageing and disease: a review, *J. R. Soc. Interface* 10 (2013) 20121004, <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.1004>.
- [143] D.C. Iliopoulos, E.P. Kritharis, A.T. Giagini, S.A. Papadodima, D.P. Sokolis, Ascending thoracic aortic aneurysms are associated with compositional remodeling and vessel stiffening but not weakening in age-matched subjects, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 137 (2009) 101–109, <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2008.07.023>.
- [144] L. Pereira, K. Andrikopoulos, J. Tian, S.Y. Lee, D.R. Keene, R. Ono, D.P. Reinhardt, L.Y. Sakai, N.J. Biery, T. Bunton, H.C. Dietz, F. Ramirez, Targetting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome, *Nat. Genet.* 17 (1997) 218–222, <https://doi.org/10.1038/ng1097-218>.
- [145] D. Guo, E.S. Regalado, L. Gong, X. Duan, R.L.P. Santos-Cortez, P. Arnaud, Z. Ren, B. Cai, E.M. Hostetler, R. Moran, D. Liang, A. Estrera, H.J. Safi, LOX Mutations Predispose to Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections. *Circ. Res.* 118, University of Washington Center for Mendelian Genomics, 2016, pp. 928–934. S.M. Leal, M.J. Bamshad, J. Shendure, D.A. Nickerson, G. Jondeau, C. Boileau, D.M. Milewicz, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.307130>.
- [146] V.S. Lee, C.M. Halabi, E.P. Hoffman, N. Carmichael, I. Leshchiner, C.G. Lian, A.J. Bierhals, D. Vuzman, Brigham Genomic Medicine, R.P. Mecham, N.Y. Frank, N.O. Stitzel, Loss of function mutation in LOX causes thoracic aortic aneurysm and dissection in humans, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) 8759–8764. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601442113>.
- [147] M.-J. Goumans, P. Ten Dijke, TGF- $\beta$  signaling in control of cardiovascular function, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 10 (2018) pii: a022210, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022210>.

- [148] C.L. Papke, H. Yanagisawa, Fibulin-4 and fibulin-5 in elastogenesis and beyond: insights from mouse and human studies, *Matrix Biol.* 37 (2014) 142–149, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.02.004>.
- [149] H. Wei, J.H. Hu, S.N. Angelov, K. Fox, J. Yan, R. Enstrom, A. Smith, D.A. Dichek, Aortopathy in a mouse model of Marfan syndrome is not mediated by altered transforming growth factor  $\beta$  signaling, *J. Am. Heart Assoc.* 6 (2017) pii: e004968, <https://doi.org/10.1161/JAHA.116.004968>.
- [150] E.P. Sproul, W.S. Argraves, A cytokine axis regulates elastin formation and degradation, *Matrix Biol.* 32 (2013) 86–94, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2012.11.004>.
- [151] A. Hayashi, T. Suzuki, H. Wachi, S. Tajima, T. Nishikawa, S. Murad, S.R. Pinnell, Minoxidil stimulates elastin expression in aortic smooth muscle cells, *Arch. Biochem. Biophys.* 315 (1994) 137–141, <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1482>.
- [152] I. Tokimitsu, S. Tajima, Inhibition of elastin synthesis by high potassium salt is mediated by  $Ca^{2+}$  influx in cultured smooth muscle cells in vitro: reciprocal effects of  $K^{+}$  on elastin and collagen synthesis, *J. Biochem. (Tokyo)*. 115 (1994) 536–539.
- [153] M. Lannoy, S. Slove, L. Louedec, C. Choqueux, C. Journé, J.-B. Michel, M.-P. Jacob, Inhibition of ERK1/2 phosphorylation: a new strategy to stimulate elastogenesis in the aorta, *Hypertension* 64 (2014) 423–430, <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03352>.
- [154] S. Tajima, A. Hayashi, T. Suzuki, T. Nishikawa, Stimulation of elastin expression by minoxidil in chick skin fibroblasts, *Arch. Dermatol. Res.* 287 (1995) 494–497.
- [155] J. Tsoaporis, F.W. Keeley, R.M. Lee, F.H. Leenen, Arterial vasodilation and vascular connective tissue changes in spontaneously hypertensive rats, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 31 (1998) 960–962, <https://doi.org/10.1097/00005344-199806000-00022>.
- [156] S. Slove, M. Lannoy, J. Behmoaras, M. Pezet, N. Sloboda, P. Lacolley, B. Escoubet, J. Buján, M.-P. Jacob, Potassium channel openers increase aortic elastic fiber formation and reverse the genetically determined elastin deficit in the BN rat, *Hypertension* 62 (2013) 794–801, <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01379>.
- [157] M. Coquand-Gandit, M.-P. Jacob, W. Fhayli, B. Romero, M. Georgieva, S. Bouillot, E. Estève, J.-P. Andrieu, S. Brasseur, S. Bouyon, N. Garcia-Honduvilla, P. Huber, J. Buján, M. Atanasova, G. Faury, Chronic treatment with minoxidil induces elastic fiber neosynthesis and functional improvement in the aorta of aged mice, *Rejuvenation Res.* 20 (2017) 218–230, <https://doi.org/10.1089/rej.2016.1874>.
- [158] R.H. Knutsen, S.C. Beeman, T.J. Broekelmann, D. Liu, K.M. Tsang, A. Kovacs, L. Ye, J.R. Danback, A. Watson, A. Wardlaw, J.E. Wagenseil, J.R. Garbow, M. Shoykhet, B.A. Kozel, Minoxidil improves vascular compliance, restores cerebral blood flow, and alters extracellular matrix gene expression in a model of chronic vascular stiffness, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 315 (2018) H18–H32, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00683.2017>.
- [159] W. Fhayli, M. Boyer, Z. Ghandour, M.P. Jacob, J.P. Andrieu, B.C. Starcher, E. Estève, G. Faury, Chronic administration of minoxidil protects elastic fibers and stimulates their neosynthesis with improvement of the aorta mechanics in mice, *Cell. Signal.* 62 (2019) 109333, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.05.018>.
- [160] S. Raveaud, P. Mezin, N. Lavanchy, B. Starcher, R.P. Mecham, J. Verdetti, G. Faury, Effects of chronic treatment with a low dose of nicorandil on the function of the rat aorta during ageing, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 36 (2009) 988–994, <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2009.05174.x>.
- [161] M. Bouhedja, B. Peres, W. Fhayli, Z. Ghandour, A. Boumendjel, G. Faury, S. Khelili, Design, synthesis and biological evaluation of novel ring-opened cromakalim analogues with relaxant effects on vascular and respiratory smooth muscles and as stimulators of elastin synthesis, *Eur. J. Med. Chem.* 144 (2018) 774–796, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.071>.
- [162] N. Boudier, W. Fhayli, Z. Ghandour, M. Boyer, K. Harrouche, X. Florence, B. Pirotte, P. Lebrun, G. Faury, S. Khelili, Design and synthesis of new potassium channel activators derived from the ring opening of diazoxide: study of their vasodilatory effect, stimulation of elastin synthesis and inhibitory effect on insulin release, *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2015) 1735–1746, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.02.043>.
- [163] C.M. Halabi, T.J. Broekelmann, R.H. Knutsen, L. Ye, R.P. Mecham, B.A. Kozel, Chronic antihypertensive treatment improves pulse pressure but not large artery mechanics in a mouse model of congenital vascular stiffness, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 309 (2015) H1008–H1016, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00288.2015>.
- [164] H. Chai, Z. Tao, W. Chen, Y. Xu, F. Huang, C. Su, X. Chen, Cortistatin attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm through inactivation of the ERK1/2 signaling pathways, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 495 (2018) 1801–1806, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.033>.
- [165] S. Sen, S. Bunda, J. Shi, A. Wang, T.F. Mitts, A. Hinek, Retinoblastoma protein modulates the inverse relationship between cellular proliferation and elastogenesis, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 36580–36591, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.269944>.
- [166] V. Cenizo, V. André, C. Reymermier, P. Sommer, O. Damour, E. Perrier, LOXL as a target to increase the elastin content in adult skin: a dill extract induces the LOXL gene expression, *Exp. Dermatol.* 15 (2006) 574–581, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2006.00442.x>.
- [167] B. Sohm, V. Cenizo, V. André, H. Zahouani, C. Pailler-Mattei, B. Vogelgesang, Evaluation of the efficacy of a dill extract in vitro and in vivo, *Int. J. Cosmet. Sci.* 33 (2011) 157–163, <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2010.00606.x>.
- [168] P. Zhang, A. Huang, J. Ferruzzi, R.P. Mecham, B.C. Starcher, G. Tellides, J.D. Humphrey, F.J. Giordano, L.E. Niklason, W.C. Sessa, Inhibition of microRNA-29 enhances elastin levels in cells haploinsufficient for elastin and in bioengineered vessels—brief report, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32 (2012) 756–759, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.238113>.
- [169] P. Zhang, A. Huang, M. Morales-Ruiz, B.C. Starcher, Y. Huang, W.C. Sessa, L.E. Niklason, F.J. Giordano, Engineered zinc-finger proteins can compensate genetic haploinsufficiency by transcriptional activation of the wild-type allele: application to Williams-Beuren syndrome and supravalvular aortic stenosis, *Hum. Gene Ther.* 23 (2012) 1186–1199, <https://doi.org/10.1089/hum.2011.201>.

**Nom :** BOËTÉ      **Prénom :** Quentin

**Date de Soutenance :** 20 décembre 2022

**Titre de la Thèse** « Étude de l'impact physiologique d'une protéine synthétique élastique dérivée de l'élastine comme signal moléculaire correcteur dans les artériopathies liées aux altérations des fibres élastiques »

**Mots-clés :** synthèse/réparation des fibres élastiques ; pharmacothérapie ; protéine élastique synthétique ; extrait d'aneth ; haploinsuffisance en élastine ; vieillissement ; hypoxie intermittente ; structure/mécanique artérielle

**Résumé :** Les fibres élastiques, composées d'élastine (90%) et de microfibrilles riches en fibrilline (10%), sont les principaux composants extracellulaires qui confèrent aux artères leur élasticité. L'altération des fibres élastiques entraîne des dysfonctionnements cardiovasculaires, comme observés dans l'haplo-insuffisance en élastine chez la souris ( $Eln^{+/-}$ ) ou chez l'Homme (sténose aortique supra-avalvulaire ou syndrome de Williams-Beuren), lors d'une hypoxie intermittente (le symptôme le plus délétère du syndrome d'apnée obstructive du sommeil) ou au cours du vieillissement.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre plus large du développement d'un traitement avec une protéine élastique synthétique (SEP), mimant plusieurs domaines de la tropoélastine (le précurseur de l'élastine), dont des domaines hydrophobes responsables de l'élasticité et des sites de liaison pour les récepteurs de l'élastine permettant de corriger les altérations des fibres élastiques vasculaires. Ce projet est soutenu par l'agence nationale de la recherche sous le nom de projet « Arterylastic » (ANR-18-CE18-0001). L'objectif de cette thèse a été d'évaluer l'impact bénéfique du traitement par la SEP sur le système cardiovasculaire de souris dans des conditions de dysfonctions vasculaires liées aux lésions des fibres élastiques induites par les trois différentes situations pathologiques citées précédemment dans le but d'améliorer la structure, la fonction et les propriétés mécaniques des artères.

Nous avons évalué dans trois modèles pathologiques de souris ( $Eln^{+/-}$ , C57Bl6/J exposées à l'hypoxie intermittente, C57Bl6/J âgées), si la SEP restaure les paramètres cardiovasculaires altérés, à savoir : la structure artérielle et cardiaque (par étude histologique et/ou pesée des cœurs), l'élasticité de la paroi artérielle et les principaux paramètres physiologiques des souris comme la pression artérielle (mesurée par cathétérisation carotidienne), la réactivité et le comportement mécanique de segments d'artères (par artériographie de pression ou de tension), et la prolifération ou la capacité de synthèse d'élastine par des cellules musculaires lisses aortiques en culture provenant de ces animaux (étudiées par tests ELISA, qPCR et western blots). Nous avons par ailleurs testé le potentiel bénéfique de l'extrait d'aneth (administré dans l'eau de boisson à 120 mg/L) sur la structure/fonction de l'aorte abdominale de souris au cours du vieillissement.

Dans cette thèse, nous avons montré que le traitement aigu par mono-injection de SEP (12 µg/g de souris) dans la veine caudale induit une néo-synthèse de l'élastine et de la fibrilline-1 chez les animaux adultes  $Eln^{+/+}$  et  $Eln^{+/-}$ , un épaississement des lames élastiques aortiques chez les animaux mâles, une forte tendance à la réduction des ruptures des lames élastiques chez les souris  $Eln^{+/-}$ , une modification de la longueur et de la rectitude des fibres de collagène chez les souris femelles adultes  $Eln^{+/+}$  et  $Eln^{+/-}$ , ainsi qu'une diminution de la rigidité de la paroi aortique, notamment chez les souris  $Eln^{+/-}$  adultes des deux sexes et âgés mâles. De façon intéressante, le traitement avec la SEP abolit la dysfonction endothéliale induite par l'haploinsuffisance en élastine chez les souris femelles  $Eln^{+/-}$ , la SEP n'a toutefois pas eu d'impact sur la pression artérielle. De plus, une diminution de la rigidité de la paroi aortique a également été observée chez les animaux C57Bl6/J adultes femelles normoxiques ou exposés à l'hypoxie intermittente, alors que la SEP n'a pas montré d'efficacité sur la mécanique artérielle dans le modèle de vieillissement (souris C57Bl6/J âgées). Les effets de la SEP dans ces deux derniers modèles de souris seront à compléter par de futures investigations de la structure artérielle. Les effets du traitement par la SEP sont vraisemblablement médiés par les récepteurs de l'élastine, en particulier l'Elastin Receptor Complex, et un possible rôle de l'intégration directe de la SEP dans les fibres élastiques artérielles reste à étudier.

Nous avons également testé dans cette thèse une seconde stratégie de restauration de la structure/fonction artérielle altérée par le vieillissement : le traitement chronique par l'extrait d'aneth mis en œuvre induit la synthèse d'élastine *de novo*, préserve l'intégrité des lames élastiques au cours du vieillissement, limite l'hypertrophie cardiaque liée à l'âge et diminue la rigidité de l'aorte de souris âgées.

La SEP ainsi que l'extrait d'aneth devraient donc être considérés comme des stratégies thérapeutiques avec un potentiel intéressant pour les traitements futurs des patients avec des fibres élastiques et une structure/fonction artérielle altérées.

**Composition du Jury :**

Pr. Julia ARACELI BUJAN VARELA - Rapporteur  
Dr. Sébastien BLAISE - Rapporteur  
Pr. François BOUCHER – résident  
Pr. Karine PICHAVANT - Examinateur  
Pr. Gaëtan GAVAZZI - Examinateur  
Dr. Anne BRIANCON-MARJOLLET - Invitée  
Dr. Romain DEBRET – Invité

**Directeur :** Gilles Faury